
**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Synthese von Reagenzien zur ultrasensitiven massenspektrometrischen
Quantifizierung von Proteinen und Steroiden**

Miriam Wallner

in Pfaffenhofen a.d. Ilm, Deutschland

2019

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidestattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 18.04.19

Wallner Miriam

Unterschrift

Dissertation eingereicht am 04.02.2019

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter/in: Dr. Stefanie Kellner

Mündliche Prüfung am 29.03.2019

Danksagung

Professor Dr. Thomas Carell danke ich für die herausfordernde Themenstellung, das großzügige Vertrauen in meine Arbeit und für die damit einhergehende Übertragung an Verantwortung. Dein Enthusiasmus bei den vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen haben mich stets motiviert und mitgerissen.

Dr. Stefanie Kellner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei den Mitgliedern der Prüfungskommission *Dr. Stefanie Kellner, Professor. Dr. Konstantin L. Karaghiosoff, Professor Dr. Lena Daumann, Professor Dr. Stefan Schwarzer, und Professor Dr. Oliver Trapp* bedanke ich mich für die Mitwirkung an der mündlichen Prüfung.

Dr. Markus Müller danke ich für die zahlreichen Ratschläge und die immerwährende Hilfe in allen Belangen. *Frau Slava Gärtner* möchte ich für die gewissenhafte Abwicklung aller bürokratischen Aufgaben danken. Bei *Kristof Hufnagel* und *Kerstin Kurz* bedanke ich mich für ihren unermüdlichen Einsatz im Arbeitskreis Carell. Der Analytikabteilungen der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die zeitnahe Vermessung meiner zahlreichen Proben.

René Rahimoff, Michael Stadlmeier, Katharina Iwan, Jana Bogen und *Christina Schneider* danke ich für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen großer Teile meiner Arbeit.

Es war mir eine große Freude meine Promotion in diesem Arbeitskreis absolvieren zu dürfen. Der gute Zusammenhalt, die stets große Hilfsbereitschaft und der offene wissenschaftlicher Austausch haben zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen. Auch die zahlreichen Aktivitäten und Ausflüge außerhalb des Labors haben meine Zeit sehr bereichert. Danke an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder des Arbeitskreis Carell für eine unvergessliche Zeit. Insbesondere dem Labor F4.017 danke ich für die herzliche Aufnahme.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie, im Speziellen meiner Mutter *Renate Wallner* sowie meinem Bruder *Michael Wallner*, die mir in den letzten Jahren viel Kraft und Halt gegeben haben. Ihr habt immer ein offenes Ohr für mich, stärkt mir den Rücken und motiviert mich. Dafür kann ich nicht genug danken.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert und auf einer Konferenz vorgestellt.

Publikationen

„A Sulfoxide-Based Isobaric Labelling Reagent for Accurate Quantitative Mass Spectrometry”
Michael Stadlmeier[#], Jana Bogena[#], **Miriam Wallner**[#], Martin Wühr, Thomas Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57, 2958–2962.

„2'-(R)-Fluorinated mC, hmC, fC and caC triphosphates are substrates for DNA polymerases and TET-enzymes” Arne Schröder, Edris Parsa, Katharina Iwan, Franziska Traube, **Miriam Wallner**, Sascha Serdjukow, Thomas Carell, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 14361-14364.

[#]: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Konferenzbeitrag

„Design and Synthesis of a new Sulfoxide-based Isobaric Labelling Reagent”, The 43rd FEBS Congress (Prag, Tschechien, Juli 2018).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Proteom	1
1.2	Massenspektrometrie in der Proteomik	1
1.3	Methoden zur Quantifizierung von Proteinen	2
1.3.1	Quantifizierung über die Methode der metabolischen Markierung.....	3
1.3.2	Markierungsfreie Quantifizierung	5
1.3.3	Quantifizierung <i>via</i> chemischer Modifizierung	5
1.4	Allgemeine Eigenschaften von Derivatisierungsreagenzien für LC/ESI-MS/MS Anwendungen 12	
1.5	Chemische Reaktivität von Derivatisierungsreagenzien	13
1.5.1	Amin-reaktive Gruppen zur Proteinmodifizierung	15
1.5.2	Carbonyl-Reaktive Gruppen zur Modifizierung von Keto-Analyten.....	17
1.6	Massenspaltbare Reagenzien.....	18
1.7	Reagenzien zur Sensitivitätssteigerung.....	20
2	Aufgabenstellung.....	23
2.1	Entwicklung eines neuen isobaren Markierungsreagenz.....	23
2.2	Entwicklung eines neuen Keton/Aldehyd-reaktiven Reagenz zur Sensitivitätssteigerung ...	23
3	Ergebnisteil.....	25
3.1	Entwurf und Synthese eines neuen sulfoxidbasierten isobaren Markierungsreagenz.....	25
3.1.1	Entwurf des neuen isobaren Markierungsreagenz	25
3.1.2	Synthese einer ¹³ C-markierten Version des neuen Derivatisierungsreagenz	27
3.1.3	Optimierung der Syntheseroute des neuen isobaren Markierungsreagenz.....	35
3.1.4	Kostengünstigere Syntheseroute für die gezielte Synthese der ¹³ C-markierten Variante SOT ² 179 (2).....	39
3.1.5	Synthese in Richtung des zweifach ¹³ C-markierten SOT-Reagenz zur gleichzeitigen Untersuchung von drei Proben	42
3.1.6	Evaluierung des neuen isobaren Markierungsreagenz	44
3.1.7	Änderung des Reagenzdesigns zur Reduktion der Datenkomplexität	52
3.2	Zusammenfassung und Ausblick	56
3.3	Keton/Aldehyd-reaktives Derivatisierungsreagenz zur Sensitivitätssteigerung schlecht ionisierbarer Analyten.....	60
3.3.1	Entwurf und Synthese eines neuen Sulfoxid-basierten Derivatisierungsreagenz.....	60
3.3.2	Bestimmung der Nachweisgrenze verschiedener Testosteron-Addukte.....	67
3.3.3	Evaluierung der Fragmentierungseigenschaften verschiedener Testosteron-Addukte	68
3.3.4	Zusammenfassung Ausblick	81
4	Experimenteller Teil	83

Inhaltsverzeichnis

4.1	Materialien und Methoden	83
4.2	Synthesevorschriften.....	86
4.2.1	Synthese von isobaren Markierungsreagenzien	86
4.2.2	Synthese von Keton/Aldehyd-reaktiven Reagenzien zur Sensitivitätssteigerung.....	103
4.2.3	Darstellung der Testosteron-Addukte	109
5	Abkürzungsverzeichnis	111
6	Literaturverzeichnis.....	114

Zusammenfassung

Die Forschung auf Proteinebene liefert wertvolle Erkenntnisse über zahlreiche biologische Prozesse. Nur mit Hilfe quantitativer Daten können wir die Zusammenhänge zwischen Proteom, Transkriptom und Genom besser verstehen. Die quantitative Proteomik vergleicht die Veränderungen der relativen Häufigkeiten von Proteinen in verschiedenen biologischen Proben. In komplexen Proteinmischungen erfolgt die Quantifizierung der Proteine in der Regel über chemische isobare Markierung der durch proteolytischen Verdau erzeugten Peptide. Mit dem Ziel einer zuverlässigen Proteinquantifizierung mit hoher Datenqualität wurden in dieser Arbeit neue isobare Reagenzien entwickelt. Gängige Reagenzien haben noch Verbesserungsbedarf hinsichtlich Sensitivität und Präzision. Isobare Marker bestehen aus Reagenz-Sets mit identischer chemischer Struktur, jedoch mit variierender Isotopenzusammensetzung. Diese Sets werden durch eine geschickte Verteilung stabiler Isotope zwischen *Reporter* und *Balancer*-Region erhalten, welche im Massenspektrometer gespalten werden. Die Generierung charakteristischer *Reporter*-Ionen ermöglicht die eindeutige Zuordnung der gemessenen Proteine zur jeweiligen Probe und somit die Untersuchung mehrerer Proben in einer einzigen Messung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein Duplex Set eines neuen, als SulfOxid-Tag (SOT) bezeichneten, isobaren Markierungsreagenzes dargestellt werden und anschließend massenspektrometrisch evaluiert werden.

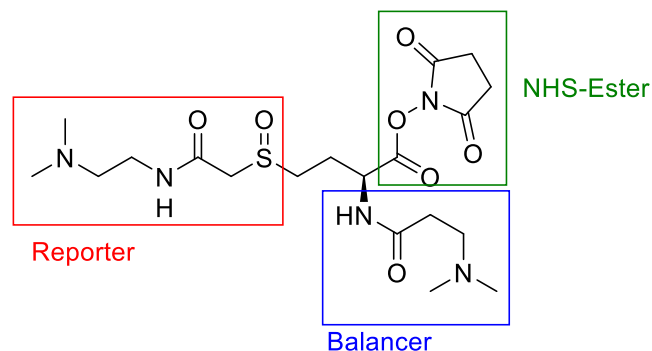


Abbildung 1 Entwurf des neuen isobaren Markierungsreagenz SOT – mit *Balancer*-Region, *Reporter*-Gruppe und Amin-reaktiver NHS-Ester Funktionalität.

Das aminreaktive Reagenz spaltet effizient und asymmetrisch im Massenspektrometer in einer Sulfoxidfragmentierung und dadurch bei geringerer Energie als die Peptide. Bei dieser Spaltung werden sowohl intensive *Reporter*-Ionen als auch *Balancer*-Peptid-Konjugate, sogenannte Komplementär-Ionen, gebildet. Der größte Vorteil des neuen Reagenzes ist die effiziente Generierung von Komplementär-Ionen, welche den Peptid-Verhältnis Verzerrungseffekt deutlich verringern kann, der durch Ionen-Interferenzen verursacht wird und bei anderen Reagenzien beobachtet wird. Auch für die klassische Quantifizierungsmethode über *Reporter*-Ionen Intensitäten ist das neue Reagenz ideal geeignet.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine ^{13}C -markierte Variante (SOT² 179) des Reagenzes synthetisiert, die zur gleichzeitigen Untersuchung zweier Proben notwendig ist. Zudem konnte die ursprünglich verwendete Syntheseroute zur erstmaligen Darstellung des Reagenzes deutlich optimiert werden. Auf diesem Weg konnte schließlich auch die Variante SOT² 180, mit Isotopenmarkierung im Reporter, dargestellt werden. Zudem konnte eine gezielte Synthesestrategie für die ^{13}C -markierte Variante SOT² 179 entwickelt werden, durch welche der Verbrauch an ^{13}C -Formaldehyd enorm reduziert werden konnte. Durch späteren Einbau der ^{13}C -Markierung, kann nun die 3,9-fache Menge an SOT² 179 hergestellt werden. Mit dem synthetisierten Reagenz-Duplex war es erstmals möglich eine tiefergehende massenspektrometrische Untersuchung des Reagenzes durchzuführen.

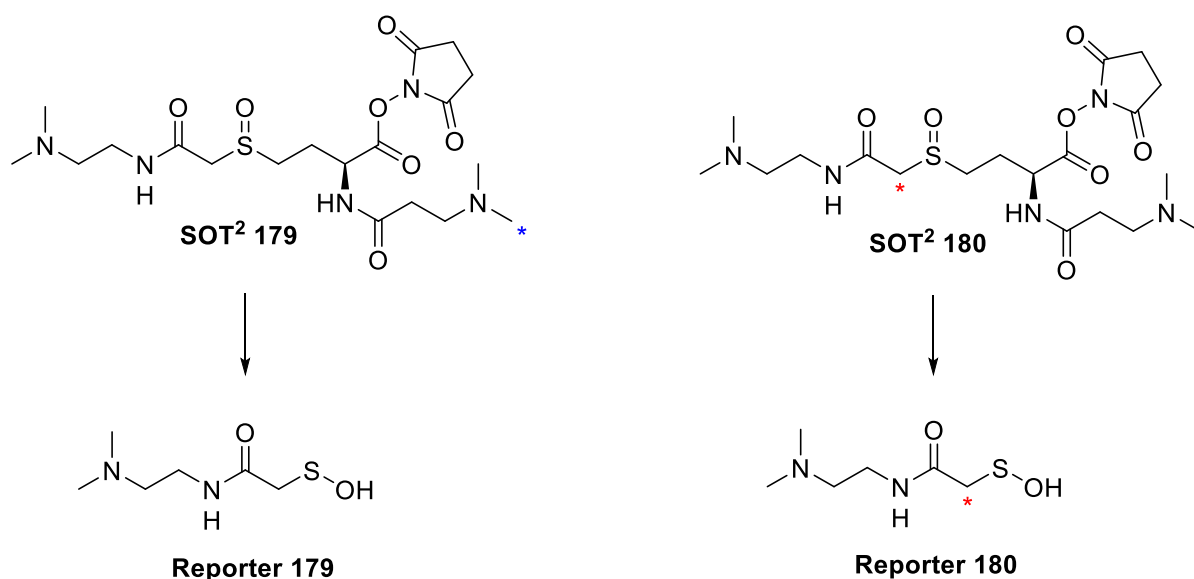


Abbildung 2 Duplex des neuen isobaren Markierungsreagenz, mit den Isotopologen SOT² 179 und SOT² 180. 179 Da und 180 Da sind die Molekulargewichte der generierten *Reporter* Ionen.

Die Messungen legten eine Überarbeitung des Reagenzdesigns zur Reduktion der Spektrenkomplexität nahe. Auf Grund geringer Markierungseffizienz und niedriger Identifikationsrate wurden zwei vereinfachte Testmoleküle entworfen. Es muss noch untersucht werden, ob die Veränderung des Reagenzdesigns eine Verbesserung darstellt.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Derivatisierungsreagenzien zur Sensitivitätssteigerung schwer ionisierbarer Analyten. Derzeit ist eine zuverlässige Mengenbestimmung von Testosteron in der Hormondiagnostik noch eine große Herausforderung. Testosteron ist das wichtigste androgene Hormon im Menschen und beeinflusst eine Vielzahl wichtiger Funktionen wie Pubertärentwicklung, Knochendichte, Muskelmasse, Energie, kognitive Funktion und Stimmung. Insbesondere bei der Bestimmung von freiem Testosteron aus weiblichen oder pädiatrischen Serumproben wird eine spezifische Methode mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit benötigt. Um einen zuverlässigen Testosteron-Nachweis zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei neue

Zusammenfassung

Keton/Aldehyd-reaktive Derivatisierungsreagenzien entwickelt. Die Hydroxylamin-basierten Reagenzien tragen eine Sulfoxidgruppe, die im Massenspektrometer bei Kollision mit einem Stoßgas leicht gespalten wird. Der Einbau dieser massenspaltbaren Gruppe erleichtert die Entstehung spezifischer Produktionen im MS²-Scan, welche für die eindeutige Identifizierung des Analyten verwendet werden. Ein Reagenz trägt zudem eine permanent geladene Trimethylammonium-Gruppe zur Steigerung der Sensitivität.

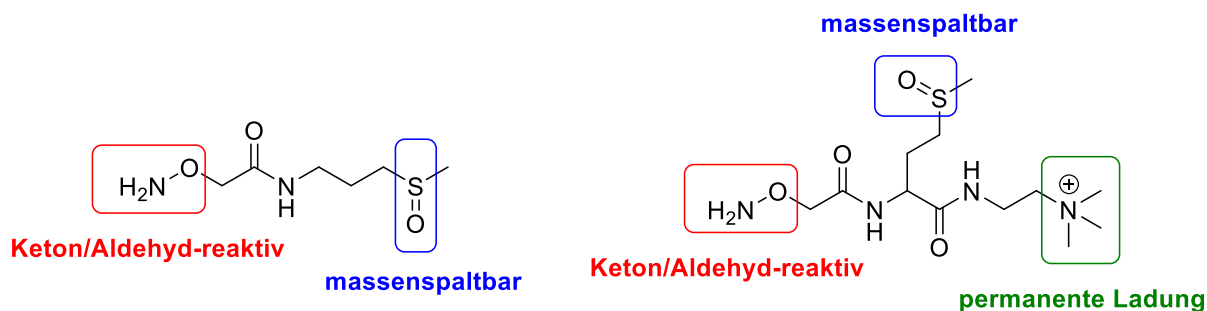


Abbildung 3 Darstellung der beiden neuen Sulfoxid-basierten Derivatisierungsreagenzien zur Sensitivitätssteigerung schlecht ionisierbarer Analyten.

Zur Evaluierung der Fragmentierungseigenschaften sowie der sensitivitätssteigernden Eigenschaften wurden die neuen Reagenzien mit Testosteron umgesetzt, über HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Die Derivatisierung mit den neuen Reagenzien führte zu einer deutlichen Signalverstärkung gegenüber underivatisiertem Testosteron. Ursache des Verstärkungseffektes ist die effiziente Generierung charakteristischer Produktionen im MS/MS-Experiment. Für die Bestimmung dieses Verstärkungseffektes wurden die Nachweisgrenzen (LOD, *limit of detection*) der Testosteron-Addukte im Vergleich zu underivatisiertem Testosteron ermittelt. Zum Vergleich wurde auch der Verstärkungseffekt von Testosteron-Addukten anderer Derivatisierungsreagenzien bestimmt. Die Messungen zeigten, dass die neuen Sulfoxid-basierten Reagenzien keine Verbesserung in Bezug auf die Sensitivitätssteigerung gängiger Reagenzien darstellen. Infolgedessen wurden weitere massenspektrometrische Experimente durchgeführt, um zu ergründen warum andere Reagenzien einen größeren Verstärkungseffekt zeigen. Da die Sensitivität der Methode von der Selektivität der Fragmentierung sowie der Spaltungseffizienz abgänglich ist wurden die verschiedenen Testosteron-Addukte hinsichtlich ihrer Fragmentierung bei verschiedenen CID- sowie HCD-Energien untersucht und verglichen. Die Spaltungseffizienz besagt wie „einfach“ die Spaltung der Addukte erfolgt. Folglich wird analysiert bei welchem Energiewert die Spaltung stattfindet. Die Selektivität der Spaltung entspricht der „Sauberkeit“ der Fragmentierung. Durch die Entstehung unspezifischer Fragmente nimmt die Sensitivität der Methode deutlich ab. Die durchgeführten Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Spaltungseffizienz. Allerdings wurden erhebliche Unterschiede in der Selektivität der Fragmentierung festgestellt. Die HCD-Fragmentierung führte bei fast allen Addukten zur Bildung einer Vielzahl unspezifischer

Zusammenfassung

Fragmente, wohingegen die CID-Spaltung zu wenigen spezifischen Fragmenten führte. Die Fragmentierung der neuen Sulfoxid-basierten Reagenzien führte vergleichsweise zu mehr unspezifischen Produktionen, wodurch die Sensitivität der Methode herabgesetzt wird. Des Weiteren konnten die Messungen zeigen, dass eine kleine Molekülgröße ideal für eine selektive Spaltung ist.

Summary

Research at the protein level provides valuable insights into numerous biological processes. Only with the help of quantitative data we can better understand the relationships between proteome, transcriptome and genome. Quantitative proteomics compares the changes of the relative abundances of proteins in different biological samples. In complex protein mixtures, the quantification of proteins is usually performed by chemical isobaric labelling of the peptides produced by proteolytic digestion. New isobaric reagents have been developed with the aim of reliable protein quantification with high data quality. Current reagents still need to be improved in terms of sensitivity and precision. Isobaric markers consist of reagent sets with identical chemical structure but varying isotopic composition. These sets are obtained by a clever distribution of stable isotopes between the reporter and the balancer region, which are cleaved in the mass spectrometer. The generation of characteristic reporter ions enables the unambiguous assignment of the measured proteins to the respective sample and thus the analysis of several samples in a single measurement. Within this work, a duplex set of a new isobaric labeling reagent, named a sulfoxide tag (SOT), was synthesized and subsequently evaluated by mass spectrometry.

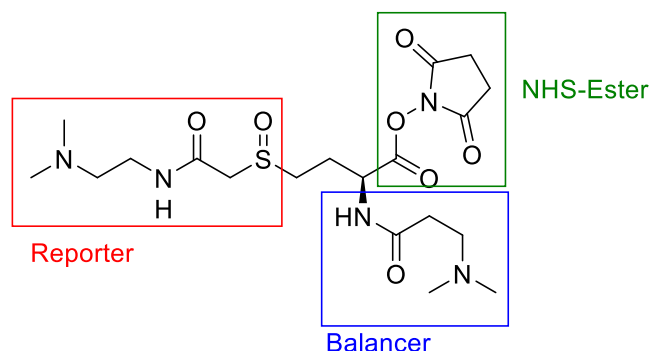


Figure 1 Design of the new isobaric labeling reagent SOT - with balancer region, reporter group and amine reactive NHS ester functionality.

The amine-reactive reagent cleaves efficiently and asymmetrically in the mass spectrometer in a sulfoxide fragmentation and thus at lower energy than the peptides. During this cleavage both intensive reporter ions and balancer-peptide conjugates, so-called complementary ions, are formed. The main advantage of the new reagent is the efficient generation of complementary ions, which can significantly reduce the peptide ratio distortion effect caused by ion interference observed with other reagents. The new reagent is also ideally suited for the classical quantification method using reporter ion intensities.

In this work, a ^{13}C -labelled variant (SOT² 179) of the reagent was synthesized, which is necessary for the simultaneous analysis of two samples. In addition, the originally used synthesis route for a first synthesis of the reagent could be significantly optimized. In this way, the variant SOT² 180, with isotope labels in the reporter, could also be synthesized. In addition,

Summary

a specific synthesis strategy for the ^{13}C -labelled variant SOT² 179 could be developed, which reduced the consumption of ^{13}C -formaldehyde enormously. By adding the ^{13}C -label later, 3.9 times the amount of SOT² 179 can now be produced. The synthesized duplex-reagent made it possible to perform a more in-depth mass spectrometric analysis of the reagent.

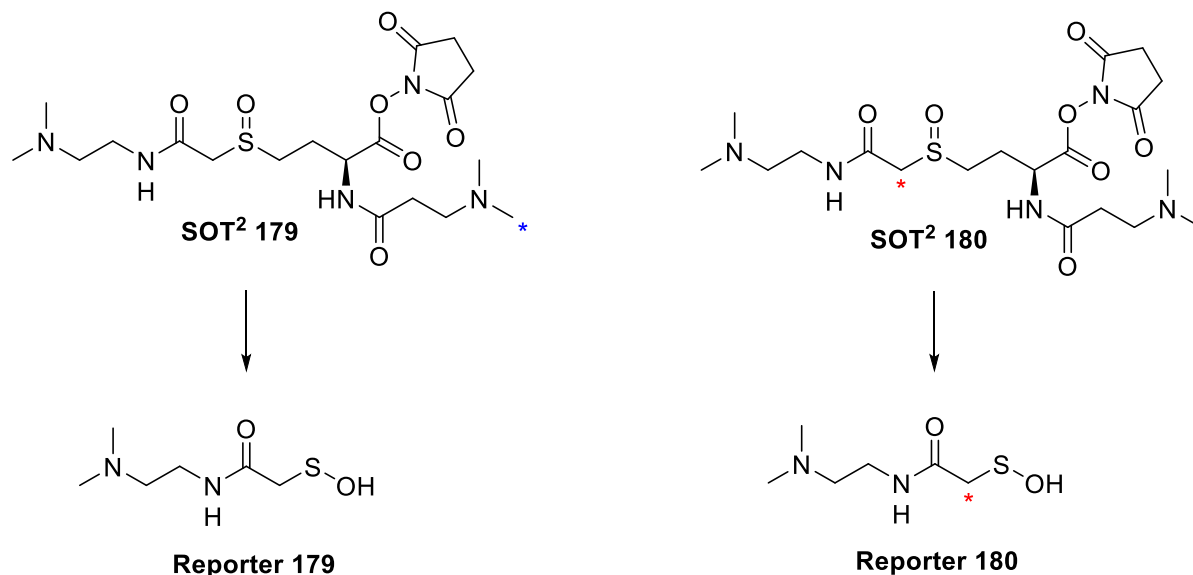


Figure 2 Duplex of the new isobaric labeling reagent, with the isotopologues SOT² 179 and SOT² 180. 179 Da and 180 Da are the molecular weights of the generated reporter ions.

The measurements suggested a change of the reagent design to reduce spectral complexity. Due to a low labeling efficiency and a low identification rate, two simplified test molecules were designed. It remains to be seen whether the change in reagent design is an improvement.

The second part of this thesis deals with the development of new derivatization reagents to increase the sensitivity of difficult-to-ionize analytes. At present, reliable quantitative determination of testosterone is still a major challenge in hormone diagnostics. Testosterone is the most important androgenic hormone in humans and influences a variety of important functions such as pubertal development, bone density, muscle mass, energy, cognitive function and mood. In particular, the determination of free testosterone from female or pediatric serum samples requires a specific method with high sensitivity and accuracy. In order to provide reliable testosterone detection, two new ketone/aldehyde reactive derivatization reagents were developed. The hydroxylamine-based reagents carry a sulfoxide group, which is easily cleaved in the mass spectrometer by collision induced dissociation. This mass cleavable group facilitates the development of specific product ions in the MS² scan, which are used for the unique identification of the analyte. One reagent carried in addition a permanently charged trimethylammonium group to increase sensitivity.

Summary

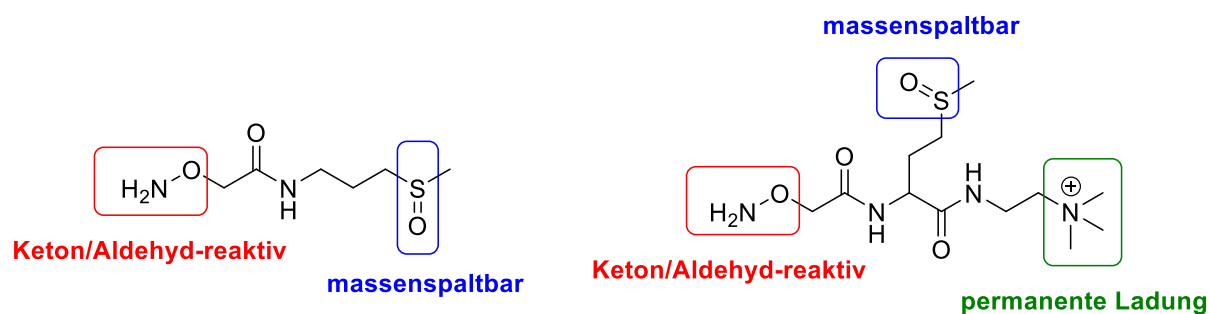


Figure 3 Presentation of the two new sulfoxide-based derivatization reagents for increasing the sensitivity of poorly ionizable analytes.

To evaluate the fragmentation properties and the sensitivity enhancing properties, testosterone was derivatized with the new reagents. The adduct was purified *via* HPLC and examined by mass spectrometry. Derivatization with the new reagents led to a significant signal amplification compared to underivatized testosterone. The amplification effect is caused by the efficient generation of characteristic product ions in the MS/MS experiment. For the determination of this amplification effect, the detection limits (LODs) of the testosterone adducts in comparison to underivatized testosterone were determined. For comparison, the amplification effect of testosterone adducts of other derivatization reagents was also determined. The measurements showed that the new sulfoxide-based reagents did not lead to an improvement compared to common reagents. As a result, further mass spectrometric experiments were conducted to investigate why other reagents showed a greater amplification effect. Since the sensitivity of the method depends on the selectivity of the fragmentation and the cleavage efficiency, the different testosterone adducts were investigated and compared with respect to their fragmentation at different CID and HCD energies. The cleavage efficiency indicates how "simple" the cleavage of the adducts is. Consequently, the energy value at which the cleavage takes place was analyzed. It was found that the selectivity of the cleavage correlates with the "cleanliness" of the fragmentation. Due to the formation of unspecific fragments, the sensitivity of the method decreases significantly. The performed measurements showed no significant differences regarding cleavage efficiency. However, significant differences in the selectivity of fragmentation were found. HCD fragmentation led to the formation of many non-specific fragments in almost all adducts, whereas CID cleavage led to only few specific fragments. Fragmentation of the new sulfoxide-based reagents generated more unspecific product ions, reducing the sensitivity of the method. Furthermore, the measurements showed that a small molecule size is ideal for selective cleavage.

1 Einleitung

1.1 Das Proteom

Das Proteom ist die Gesamtheit aller Proteine, zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem definierten Ort. Es ist die Darstellung des Genoms auf funktioneller Ebene. Die Erkenntnisse über das Genom aus den Sequenzierdaten^[1-2] erklären nicht, wie die einzelnen funktionellen Einheiten zusammenwirken. Während das Genom uns sagt, was möglich ist, sagt uns das Proteom, was funktionell vorhanden ist. Das Proteom ist sehr dynamisch. Es variiert von Zelltyp zu Zelltyp, unterliegt der zeitlichen Regulierung der Proteinsynthese und ist stark abhängig von äußeren Umwelteinflüssen. In jeder Zelle laufen gleichzeitig zahlreiche biologische Prozesse ab, die im Wesentlichen von Proteinen katalysiert und gesteuert werden. Diese bilden als Proteom eine hochgradig strukturierte Einheit. Auf Grund schneller technologischer Fortschritte, sind heutzutage mehrere tausend Genome verschiedener Organismen entschlüsselt.^[3] Im Gegensatz dazu sind proteomische Daten unvollständig. Es kann nicht mal eine genaue Zahl Protein-kodierender Gene benannt werden. Sie kann nur grob abgeschätzt werden.^[3-4] Die etwa 20.500 humanen Protein kodierenden Gene führen jeweils zu vielen weiteren Proteinvarianten, einschließlich Gen-Spleißprodukten und post-translationalen Modifikationen.^[5] Das *HUPO Human Proteome Project* (HPP) berichtet jährlich über die Fortschritte auf dem gesamten Gebiet der Identifizierung und Charakterisierung der Humanprotein-Teileliste.^[6] Durch ein besseres Verständnis des Proteoms können wir einen tieferen Einblick in systemweite Prozesse erlangen und somit die Zusammenhänge zwischen Proteom, Transkriptom und Genom besser verstehen.^[7]

1.2 Massenspektrometrie in der Proteomik

Die Massenspektrometrie liefert nie da gewesene Einblicke in Zusammensetzung, Kontrolle, Struktur und Funktion des Proteoms. Das Zeitalter MS-basierter Proteomik begann mit der Entwicklung sanfter Ionisierungsmethoden wie der matrixgestützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI)^[8] und der Elektrospray-Ionisation (ESI)^[9] in den 80er Jahren, für die Koichi Tanaka und John Fenn 2002 den Nobelpreis erhielten. Nanospray-Techniken haben die Nachweisgrenzen für Peptide in den attomolaren Bereich verschoben. Die Ärosolbildung der Flüssigkeit in geladene Tröpfchen erfolgt im Nanospray über eine feine Nadel bei geringerer Flussrate als im klassischen ESI-Spray. So wird eine bessere Ionensichtbarkeit und eine höhere Toleranz gegenüber Salzen erreicht.^[10] Die Kopplung mit hoch-leistungsfähigen Trenntechniken ermöglicht die Quantifizierung hunderttausender Peptide aus komplexen Proben.^[11] Die MS-basierte Proteomik-Forschung lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: Die *Top-Down* vs. die *Bottom-up* Strategie (Abbildung 4).^[12] Der sogenannte *Bottom-up* Ansatz, auch bekannt als *Shotgun* Methode, hat sich als Standardmethode der Proteinanalyse durchgesetzt. Bei diesem Ansatz werden die Proteine

zunächst enzymatisch verdaut. Für den Verdau wird meist das Enzym Trypsin verwendet, welches nach Arginin und Lysin schneidet.^[13] Die resultierenden Peptide, mit einer Durchschnittslänge von etwa 10 Aminosäuren, werden anschließend über Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Die Spaltung der Peptide im Massenspektrometer liefert ein diagnostisches Fragment-Ionenspektrums. Diese Peptidfragmente geben Rückschluss auf die vorhandenen Proteine. Die Proteinidentifizierung erfolgt mit Hilfe geeigneter Software, wie SEQUEST^[14] oder MASCOT^[15]. Die generierten Daten werden im automatisierten Datenbankabgleich ausgewertet. Bei der Analyse von intakten Proteinen kann man auch einen *Top-Down* Ansatz wählen, bei dem intakte unverdaute Proteine im Massenspektrometer gemessen werden. Allerdings bietet sich die Methode nicht für komplexe Proteinmischungen an. Auch das hohe Molekulargewicht intakter Proteine ist ein Problem für einige Geräte.

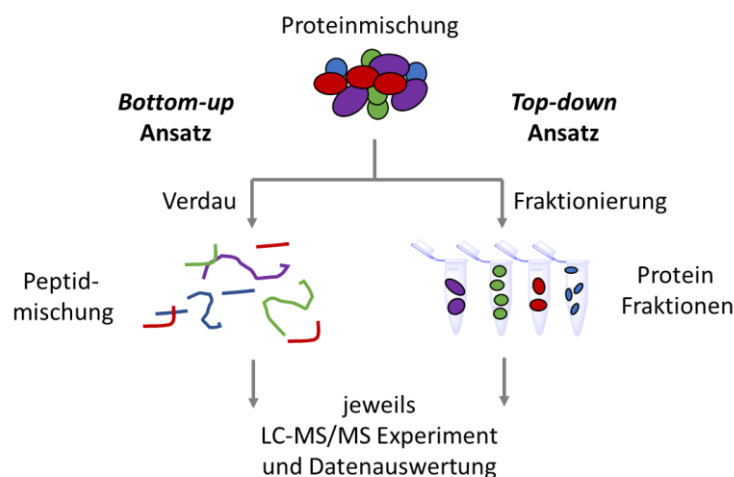


Abbildung 4 Vergleich der beiden Ansätze eines proteomischen Experimentes, welche sich in der Probenvorbereitung unterscheiden. Im *Bottom-Up* Ansatz erfolgt die massenspektrometrische Analyse auf dem Peptid-Level. Im *Top-Down* Ansatz werden ganze Proteine untersucht.

1.3 Methoden zur Quantifizierung von Proteinen

Mit den beiden vorgestellten Methoden der massenspektrometrischen Proteinanalyse kann die qualitative Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Proteine durchgeführt werden. Zum besseren Verständnis biologischer Systeme werden jedoch auch quantitative Vergleiche verschiedener Zellzustände benötigt.^[16-17] Die quantitative Proteomik vergleicht Veränderungen der relativen Häufigkeit von Proteinen in verschiedenen biologischen Proben. Diese quantitativen Daten geben Aufschluss darüber, wie biologische Systeme auf Umwelteinflüsse reagieren und decken Störungen auf genomischer Ebene auf, indem sie Veränderungen in der Proteinexpression identifizieren. Moderne massenspektrometrische Methoden haben die Art und Weise, biologische Systeme zu erforschen, grundlegend verändert. Sie haben die Fähigkeit tausende Proteine und posttranslationelle Modifikationen (PTMs) zeitgleich zu messen.^[18] Somit geben sie uns einen umfassenden Überblick über alle

Proteine in einem biologischen System, unter bestimmten Bedingungen. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl an quantitativen Proteomik-Methoden entwickelt, die eine hohe Proteomabdeckung erreichen, sowie eine genaue Quantifizierung ermöglichen und auf eine Vielzahl verschiedener Probentypen anwendbar sind. Es haben sich insbesondere folgende Methoden etabliert:

- Die Quantifizierung über metabolische Markierung (1.3.1)
- Die markierungsfreie Quantifizierung (1.3.2)
- Die Quantifizierung über chemische Markierung (1.3.3)

Durch die kontinuierliche Verbesserung massenspektrometrischer Geräte und Methoden sowie deren softwaregestützte Datenauswertung ist die Proteomik traditionellen Quantifizierungsmethoden in einigen Aspekten überlegen. Lange Zeit war die klassische Methode zur Proteinexpressionsanalyse die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*2D-PAGE*). Die Analyse des Proteoms *via* 2D-Gelelektrophorese ist in ihrer Anwendung jedoch eingeschränkt, da die Anzahl an quantifizierbaren Proteinen im Gel limitiert ist.^[19] Auch die schlechte Reproduzierbarkeit ist ein erheblicher Nachteil dieser Methode. Zudem kann es zur Komigration verschiedener Proteine in einer Gelbande kommen. Durch die Möglichkeit viele Proteine gleichzeitig zu untersuchen, stellt die Proteomik auch die klassischen *Western Blots* in den Schatten. Im *Western Blot* werden die Proteine zusätzlich zur Auftrennung nach dem Molekulargewicht in der Gelelektrophorese, mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Auch bei der Erforschung von Protein-Biomarkern ist die LC-MS den traditionellen Methoden wie ELISAs (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) überlegen, wenn man sie mit Affinitätsaufreinigung koppelt. Man kann den aufwändigen Prozess umgehen, qualitativ hochwertige Antikörper herzustellen, da die Massenspektrometrie Proteine sogar direkt aus biologischen Flüssigkeiten eindeutig und genau identifizieren und quantifizieren kann.^[20] Zur finalen Verifizierung der Hits werden jedoch immer noch Antikörper benötigt. Die wichtige Rolle Massenspektrometrie-gestützter Methoden wird in der beachtlichen Anzahl an Publikationen über quantitative MS-Studien in den letzten Jahren deutlich. Ein Beispiel hierfür ist die Epigenetik-Forschung, welche in den letzten Jahren zahlreiche Publikationen zur massenspektrometrischen Untersuchung von Protein-Phosphorylierung und -Acetylierung hervorgebracht hat.^[21-22]

1.3.1 Quantifizierung über die Methode der metabolischen Markierung

Bei der metabolischen Markierungsstrategie zur Proteinquantifizierung werden während des Zellwachstums und der Zellteilung Isotopenmarkierungen in jedes Protein eingeführt. Da die physikalisch-chemischen Eigenschaften von natürlichen und mit stabilen Isotopen markierten Peptiden nahezu identisch sind, eignet sich die Markierung mit stabilen Isotopen ideal zur Proteinquantifizierung. Die Markierung erfolgt bei dieser Methode zum frühestmöglichen

Einleitung

Zeitpunkt des proteomischen *Workflows*, wodurch die Entstehung von systematischen Fehlern, die bei der Probenbehandlung entstehen, minimiert werden können. Die populärste metabolische Markierungsmethode ist die stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC, *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*).^[23] Im klassischen SILAC-Experiment werden dem Kulturmedium isotopenmarkiertes Arginin und Lysin (^{13}C , ^{15}N) zugegeben. So wird sichergestellt, dass ein Großteil der Peptide nach dem tryptischen Verdau mindestens eine markierte Aminosäure enthält. Die relative Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich der MS-Intensitäten von markierten und unmarkierten Peptiden, beziehungsweise deren Isotopenmuster. Die Limitierung der Methode liegt im Multiplexing, das heißt der gleichzeitigen Untersuchung verschiedener Proben. Aufgrund der begrenzten Anzahl isotopenmarkierter Versionen an Aminosäuren ist auch die Anzahl der Zellzustände, die direkt verglichen werden können, einschränkt. Im klassischen SILAC Experiment (Abbildung 5) können maximal 2 Proben gleichzeitig untersucht werden, indem man zwischen „leicht und schwer“ unterscheidet.

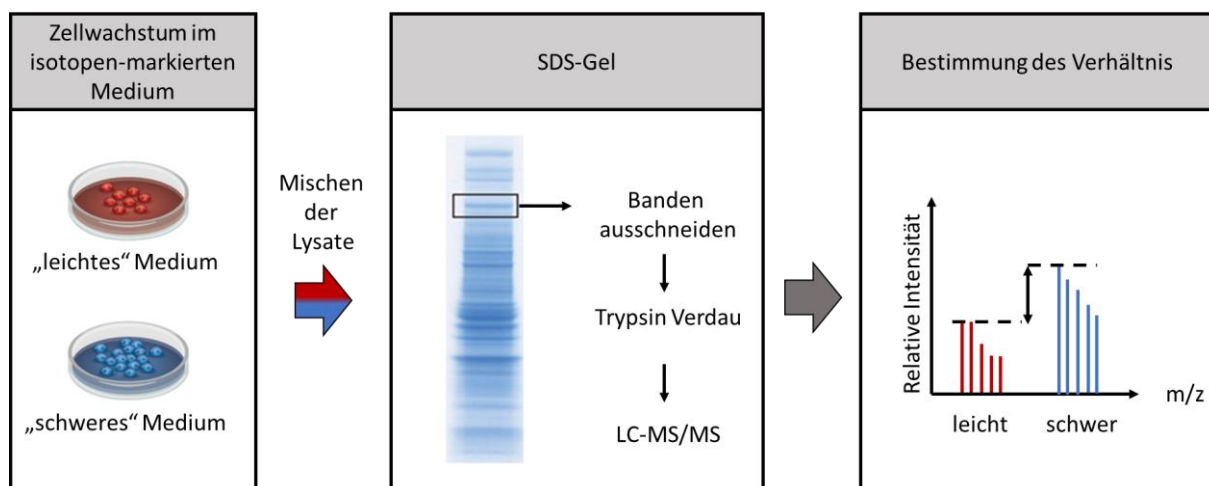


Abbildung 5 Schematische Darstellung eines klassischen SILAC Experimentes. Zu Beginn des SILAC Experimentes wird das Zellmedium entweder mit normalem „leichtem“ Leucin und Arginin (rot) oder schwerem isotopenmarkiertem Leucin und Arginin (blau) versehen. Die schwer und leicht markierten Proteine werden direkt nach der Lyse gemischt, zusammen aufgereinigt und verdaut. Die Peptidquantifizierung erfolgt anhand der Verhältnisse der Signalintensitäten (rot zu blau).

Durch zusätzliche Verwendung deuterierter Aminosäuren können bis zu 5 Proben gleichzeitig untersucht werden. Jedoch führt der Deuterium-Isotopen Effekt zu einer Verschiebung der Retentionszeiten, was einen Vergleich in der massenspektrometrischen Untersuchung erschwert.^[24] Durch Verwendung artifizierlicher Wachstumsbedingungen kommt es zur Veränderung von Proteinexpressionsmustern. Zudem ist die Inkorporierung der unnatürlichen Aminosäuren schwer vorhersehbar, was die Reproduzierbarkeit der Methode beeinträchtigt. Aus dem klassischen SILAC Experiment wurden verschiedene Varianten der SILAC Methode entwickelt um die Limitierung des Multiplexings zu verbessern oder die Flexibilität der Methode zu demonstrieren.^[25-31] Ein Beispiel ist die Neutronen-kodierende SILAC^[32] (NeuCode SILAC, *neutron encoding*) welche den Massendefekt, also den subtilen Unterschieden der nuklearen

Bindungsenergien, die zwischen ^{13}C (+1.0034), ^2H (+1.0062) und ^{15}N (+0.997) bestehen, nutzt. Die verwendeten Lysin-Isotopologen unterscheiden sich in ihrer exakten Masse nur um 12 mDa anstelle der 4 oder 8 Da des klassischen SILAC Experimentes. Die geringen Massendifferenzen können jedoch nur an sehr hoch-auflösenden Geräten und durch Reduzierung des Massen-Isolierungsfensters gemessen werden.

1.3.2 Markierungsfreie Quantifizierung

Eine zweite Methode zur Peptidquantifizierung ist die markierungsfreie Methode (LFQ, *label free quantification*). Wie der Name bereits impliziert, werden bei dieser Methode keine Isotopenmarker zur Proteinquantifizierung benötigt. Man kann die LFQ grob in zwei Herangehensweisen unterteilen.

1. **Direkte Quantifizierung** über Signalintensitäten
2. **Indirekte Quantifizierung** durch Auszählen der Spektren

Der intensitätsbasierte Ansatz verwendet die MS-Signalintensität der Peptide oder der Proteine für die Quantifizierung. Im *Bottom-Up* Ansatz werden typischerweise die Ionenintensitäten eines Peptids von Interesse über das Chromatogramm integriert. Die Linearität der gemessenen Signalantwort mit der Peptidkonzentration wurde erstmals 2002 von *Bondarenko et al.* gezeigt.^[33] Im Spektrumzählansatz wird über die Zahl an PSMs (peptide to spectrum matches) die Proteinmenge bestimmt. Die Zahl an PSMs ist die Anzahl identifizierter Peptid Spektren die einem Protein zugeordnet werden können. Der PSM Wert hängt nicht nur von der Zahl identifizierter Peptide ab, sondern auch von der Proteinabundanz. Die Proteinmenge korreliert mit der Zahl an eindeutig identifizierten Peptiden sowie der Proteinsequenzabdeckung. Mit der Methode der indirekten Quantifizierung wird ein größerer Dynamikbereich sowie eine bessere Reproduzierbarkeit als über die direkte Quantifizierung erreicht.^[33-36] Nachteil der markierungsfreien gegenüber der markierungsbasierten Quantifizierung ist insbesondere die geringe Reproduzierbarkeit aufgrund der getrennten Probenanalyse. Eine strikt einzuhaltende gleichbleibende Probenvorbereitung mit strikten Zeitabfolgen ist unabdingbar. Zudem können über diese Methode keine geringen Konzentrationsänderungen bestimmt werden. Der größte Vorteil der Methode ist die Möglichkeit auf teure Isotopenmarkierungen zu verzichten.

1.3.3 Quantifizierung via chemischer Modifizierung

Neben der markierungsfreien und der metabolischen Markierung, hat sich die Methode der chemischen Markierung für die Quantifizierung von Proteinen etabliert. Diese ist für ein breites Spektrum an Anwendungen geeignet, da sie auf diverse Proteine unabhängig von ihrer Herkunft anwendbar ist. Diese post-biosynthetische Markierung basiert auf dem Hinzufügen von isotopenkodierten Markern zu Peptiden oder Proteinen. Die chemische Modifizierung umfasst Techniken wie die isotopenmarkierte Dimethylierung primärer Amine^[37],

isotopenmarkierte Affinitätstags (ICATs)^[38] (1.3.3.1) sowie isobare Marker^[39] (1.3.3.2). Mit Ausnahme der isobaren *Tags*, werden bei Derivatisierungsmethoden mit stabilen Isotopen schwere und leichte Peptidpaare erzeugt, die im MS¹-Scan geringe Massendifferenzen aufweisen. Somit kann man identische Peptide aus zwei oder mehr Proben unterscheiden. Durch statistische Auswertung der Peptidverhältnisse, kann man schließlich quantitative Proteinwerte ableiten. Isobare *Tags* verwenden ein anderes Konzept für die Peptid Quantifizierung. Auch hier werden identische Peptide verschiedener Proben unterschieden. Jedoch erfolgt die Unterscheidung der Peptidpaare nicht im MS¹-Scans, sondern im MS²-Scan.

Der MS² Scan, auch bekannt als MS/MS, ist ein zusätzlicher Schritt nach dem MS¹-Scan im Tandem-Massenspektrometer (Abbildung 6). Nach der Ionisierung in der Ionenquelle werden die Ionen durch das *m/z*-Verhältnis (Masse/Ladungs-Verhältnis) aufgetrennt (MS¹-Scan). Im MS/MS Experiment folgt nun ein zusätzliche Isolierungs- und *in-source* Fragmentierungsschritt. Bestimmten Ionen (Vorläuferionen, *precursor-ions*) eines *m/z*-Wertes werden ausgewählt und durch kollisionsbedingte Dissoziation fragmentiert (Produktionen). Die erzeugten Ionen werden ebenfalls durch das *m/z*-Verhältnis aufgetrennt und nachgewiesen (MS²-Scan).

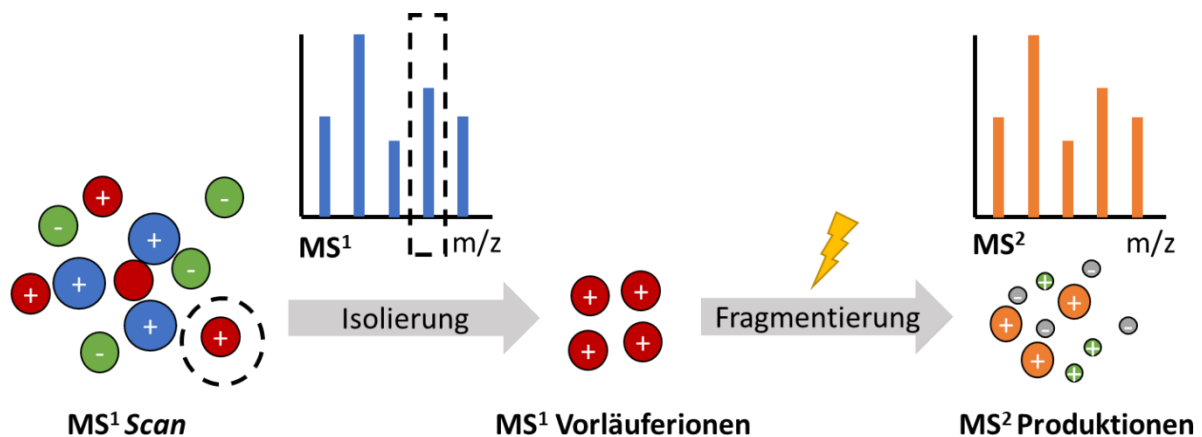


Abbildung 6 Schematische Darstellung eines MS/MS-Experimentes. Ionen eines bestimmten Masse-/Ladungsverhältnisses (Vorläuferionen) werden ausgewählt und isoliert. Nach Fragmentierung durch kollisionsbedingte Dissoziation werden Produktionen erzeugt. Diese Produktionen werden wie im MS¹-Scan nach *m/z*-Verhältnis getrennt (MS²-Scan).

Die Quantifizierung über isobare *Tags* erfolgt auf dem MS²-Level. Die chemische Struktur dieser *Tags* ist identisch, sie zeichnen sich jedoch durch variierende Isotopenzusammensetzung aus. Jede Probe wird mit einer anderen Isotopenvariante aus einem Set isobarer Massen-*Tags* markiert. Die Proben werden gemischt und anschließend gleichzeitig im Massenspektrometer analysiert. Da alle Reagenzien des Sets isobar sind, erscheinen die derivatisierten Peptide als zusammengesetzter Peak im MS¹-Scan bei gleichem *m/z*-Wert. Bei der Fragmentierung im MS²-Scan werden *Reporter*-Ionen generiert,

die sich im m/z -Wert unterscheiden. Die Quantifizierung erfolgt durch direkte Korrelation der relativen Intensität der *Reporter*-Ionen.

1.3.3.1 Massen Tags – isotopenmarkierte Derivatisierungsreagenzien

Im Jahr 1999 wurden erstmals isotopenmarkierte Derivatisierungsreagenzien beschrieben, die den quantitativen Vergleich des relativen Expressionsgrades von Proteinen aus zwei verschiedenen Zuständen desselben biologischen Systems ermöglichen. ^[40] *Aebersold et al.* entwickelte die sogenannten ICATs (*isotope-coded affinity tags*). Diese isotopenmarkierten Affinitätsmarker sind biotinylierte Iodacetamid-Derivate, die mit den Sulfhydrylgruppen der Cystein-Seitenketten denaturierter Peptide reagieren (Abbildung 7). Die Biotin-Gruppe ermöglicht eine Anreicherung der derivatisierten Peptide auf einer Streptavidin oder Avidin-Säule. Zur Quantifizierung benötigt man ein Set aus zwei Reagenzien, einer unmarkierten „leichten“ und einer isotopenmarkierten „schweren“ Variante. Durch Deuterierung in der *Spacer*-Region erhält man die schwere isotopenmarkierte Variante des Reagenzes.

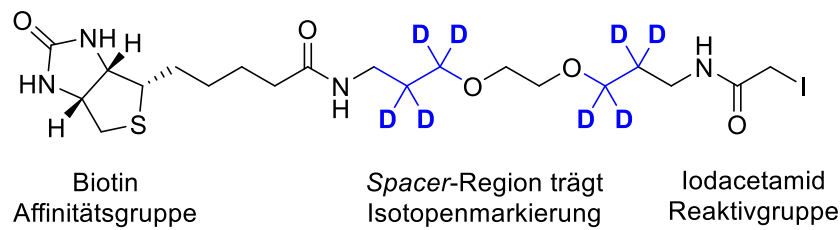


Abbildung 7 Struktur des ICAT Reagenz, mit Biotingruppe zur Affinitätsaufreinigung, *Spacer*-Region für die Isotopenmarkierung und Cystein-reaktivem Iodacetamid.

Abbildung 8 zeigt die schematische Darstellung eines ICAT-Experimentes. Durch Derivatisierung mit dem Reagenz-Set werden schwere und leichte Peptidpaare erzeugt. Nach Verdau und Vereinigung kann mit Hilfe der Biotin-Gruppe eine Affinitätsanreicherung erfolgen. Die relative Häufigkeit wird durch das Verhältnis der Signalintensitäten der schwer/leicht markierten Peptidpaare bestimmt.

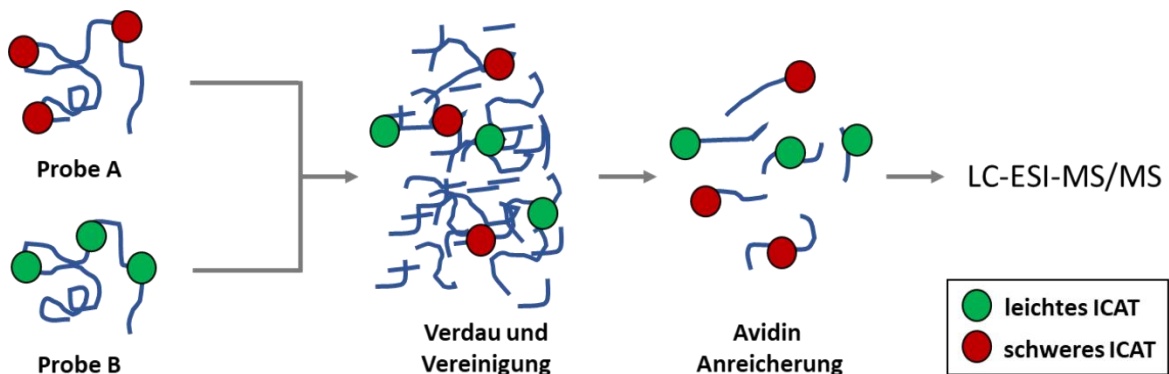


Abbildung 8 Schematische Darstellung eines Experimentes mit ICAT-Reagenz.

Auf Grund des Deuterium-Isotopeneffektes ist die Isotopenmarkierung mit Deuterium nicht ideal. Sie führt zu einer Retentionszeiten-Verschiebung im Chromatogramm. Um dieses

Problem zu umgehen, wurde eine ^{13}C -markierte Variante entwickelt. Dieses cICAT (*cleavable* ICAT) Reagenz besitzt zudem eine säurespaltbare Gruppe.^[41] Nach der Anreicherung können die markierten Peptide vollständigen von der Streptavidin-Säule eluiert werden. Größter Nachteil des ICAT Reagenz ist die Limitierung auf 2 Proben, sowie die Einschränkungen durch die Cystein-reaktive Gruppe. Einige Peptide/Proteine verfügen über keine Cystein-Reste zur Modifizierung. Derzeit werden thiolreaktive ICATs vor allem für die Untersuchung von Cystein/Thiol Redoxprozessen verwendet. Diese Prozesse regulieren Proteinfunktionen in vielen intrazellulären Katalyse- und Signalprozessen.^[42]

1.3.3.2 Isobare Tags – iTRAQ und TMT

Um ein höheres Multiplexing, die zeitgleiche Messung mehrerer Proben, zu ermöglichen, wurden isobare Marker entwickelt. Isobare Markierungsreagenzien, die sogenannten *Isobaric Tags*, sind Sets von Molekülen mit gleichem Molekulargewicht jedoch unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung. Isobare Reagenzien bestehen aus drei funktionellen Einheiten: Einer Reaktivgruppe zur Proteinmodifizierung, einem *Balancer* und einer *Reporter*-Gruppe. Der *Balancer* dient dazu die Massendifferenz auszugleichen, die durch Einführung einer Isotopenmarkierung im *Reporter* erfolgt. Durch geschickte Verteilung der stabilen Isotope zwischen *Reporter*- und *Balancer*-Gruppe erhält man mehrere Reagenzien mit identischem Molekulargewicht. Die massenspaltbare Gruppe ermöglicht die Generierung von *Reporter*-Ionen im LC/ESI-MS/MS Experiment. Die relativen *Reporter* Intensitäten werden genutzt um quantitative Informationen der Peptide aus verschiedenen Proben abzuleiten. Abbildung 9 zeigt die zwei wichtigsten Vertreter solcher isobaren Markierungsreagenzien, die „*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*“ (iTRAQ)^[43-44] und die *Tandem-Mass-Tags* (TMT).^[45]

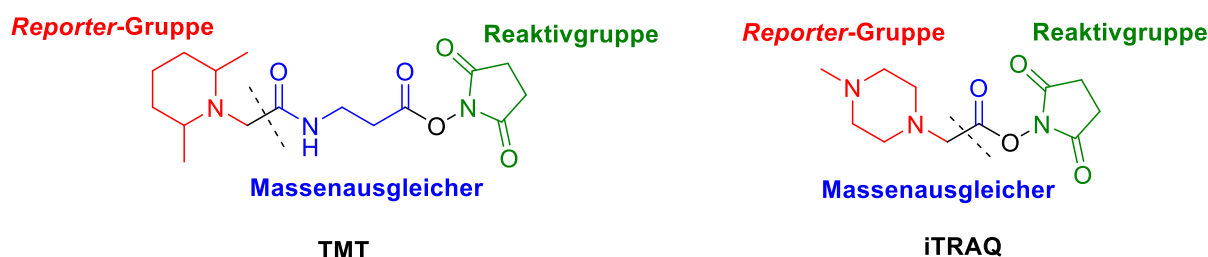


Abbildung 9 Chemische Struktur der isobaren Derivatisierungsreagenzien. TMT und iTRAQ, mit Reaktivgruppe (grün), *Balancer* (blau) und *Reporter*gruppe (rot). Die gestrichelten Linien zeigen die Bruchstellen der Moleküle zur Freisetzung der *Reporter*ionen im MS/MS-Experiment.

Abbildung 10 zeigt den schematischen Ablauf eines isobaren Markierungsexperimentes zur gleichzeitigen Untersuchung zweier Proben. Nach dem enzymatischen Verdau, werden die verschiedenen Peptidproben mit zwei unterschiedlichen isobaren Markierungen versehen. Das eine Reagenz trägt die Isotopenmarkierung im *Reporter* (blau), das dazu isobare Reagenz besitzt sie in der *Balancer*-Region (rot). Die markierten Peptide werden für die LC-MS/MS Analyse vereint. Im MS^1 -*Full-Scan* sind die sequenzgleichen Peptidionen der verschiedenen

Einleitung

Proben auf Grund gleicher Massen ununterscheidbar. Bei der Fragmentierung im Massenspektrometer werden leichte (rot) und schwere (blau) *Reporter*-Ionen im niedrigen m/z -Bereich des MS^2 -Scans freigesetzt. Aus den relativen Intensitäten der *Reporter*-Ionen kann man die relativen Peptidmengen ableiten.

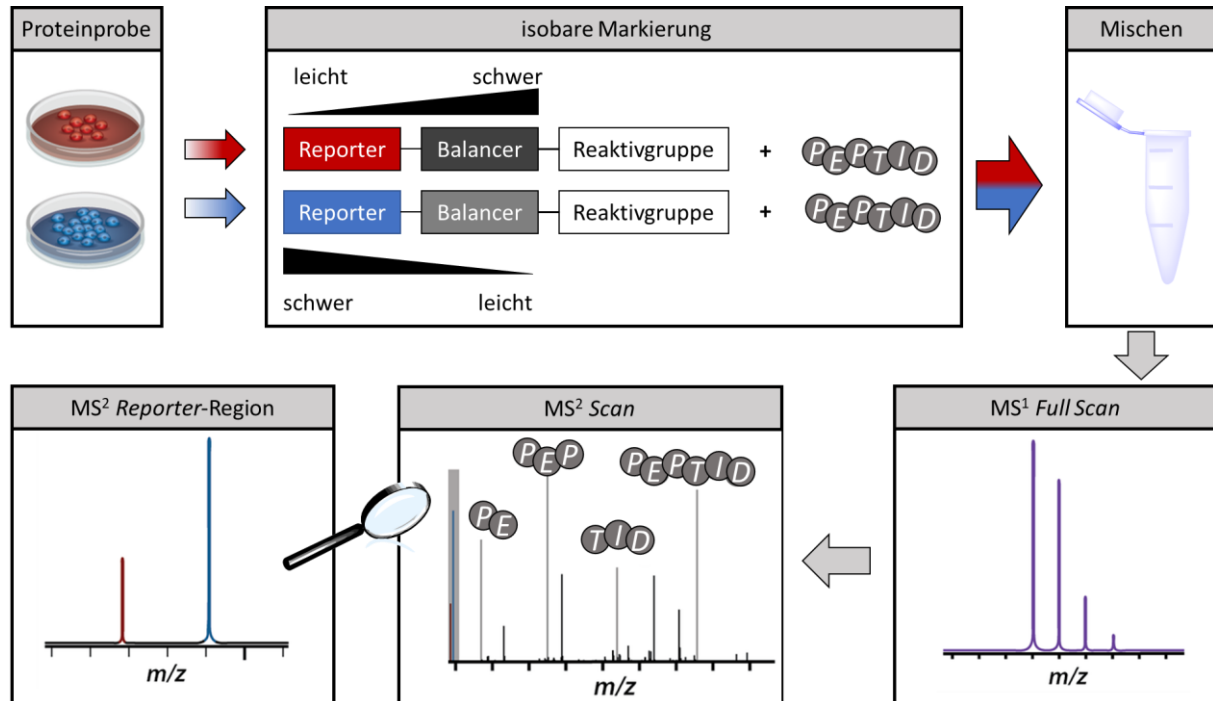


Abbildung 10 Schematischer Ablauf eines Derivatisierungsexperimentes mit 2 isobaren Reagenzien. Nach Lyse, Proteinverdau sowie Reduktion und Alkylierung, werden die Peptidmischungen jeweils mit einer Isotopenvariante des Reagenz Sets markiert. Die markierten Peptidproben werden gemischt und anschließend via LC-MS/MS analysiert. Im MS^1 -Scan erscheinen die sequenzgleichen Peptide der verschiedenen Proben als zusammengesetzter Peak bei gleichem m/z -Wert. Nach Vorläufer-Isolierung und Fragmentierung im Massenspektrometer erscheinen zwei unterscheidbare Peaks im MS^2 -Scan, die dem leichten (rot) und schweren (blau) *Reporter* zugeordnet werden können. Die relativen Verhältnisse der *Reporter*-Ionen-Intensitäten gibt die relative Menge des analysierten Peptids in der Peptidmischung der zwei verschiedenen Proben an.

Für spezielle Anwendungen haben sich neben den Amin-reaktiven Reagenzien TMT und iTRAQ, Varianten mit anderen Reaktivgruppen etabliert (Abbildung 11). Für die Analyse von Carbonylierungsstellen werden vor allem eine Hydrazin-funktionalisierte iTRAQ Variante (iTRAQH)^[46] sowie eine Hydrazin-basierte und eine Aminoxy-basierte TMT Variante^[47] eingesetzt. Für die irreversible Markierung von Sulfhydryl-Gruppen (-SH) steht das Iodacetamid-basierte IodoTMT zur Verfügung.^[48] Mit IodoTMT können beispielweise Redox-abhängige Cystein-Modifikationen, wie Protein-S-Nitrosylierung, detektiert und quantifiziert werden.^[48-50]

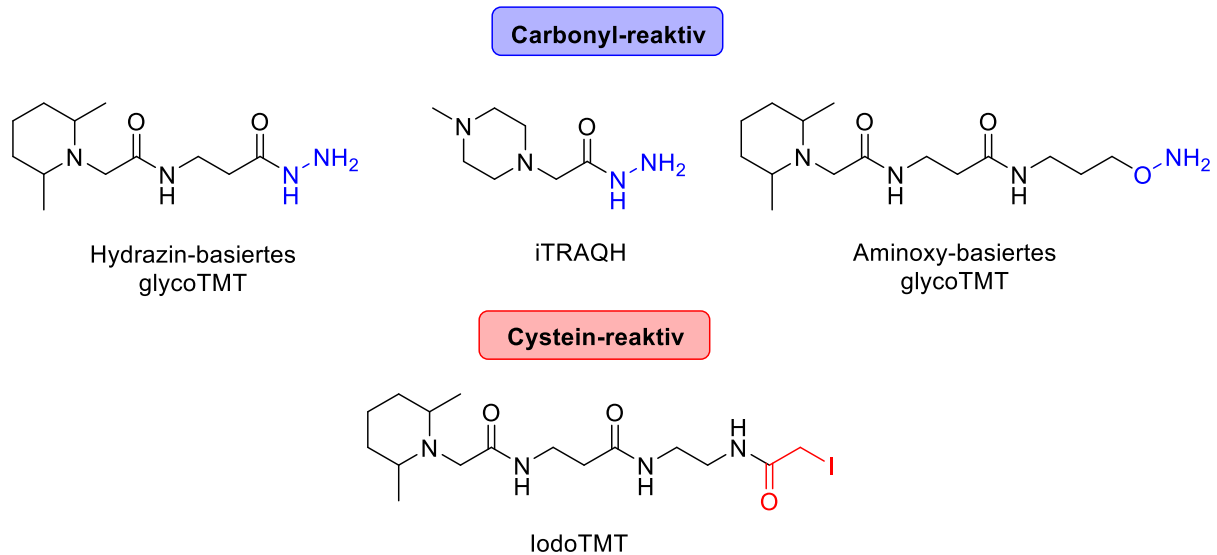


Abbildung 11 Gängige carbonyl-reaktive und cystein-reaktive Markierungsreagenzien.

Die Methode der isobaren Markierung ist der metabolischen Markierung sowie der markierungsfreien Methode bei der Proteinmengenbestimmung in Bezug auf Präzision und Reproduzierbarkeit überlegen.^[51] Die Quantifizierung über isobare Markierung ermöglicht im Gegensatz zu anderen stabilen Isotopenmarkierungstechniken eine Hochdurchsatzquantifizierung durch Probenmultiplexing. Durch die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben kann die Anzahl an Datensätzen reduziert werden. Somit wird die Analysezeit sowie die *Run to Run* Variation verringert. Zudem ist das Signal zu Rausch Verhältnis (S/N-Verhältnis; *signal to noise*) MS²-basierter Methoden auf Grund des zusätzlichen Isolierungsschrittes besser als bei MS¹-basierten Methoden. Ein Nachteil der Methode ist die Verzerrung der Mengenverhältnisse zu kleineren Werten, auf welche im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

1.3.3.3 Das *Ratio-Distortion Problem* und Lösungsansätze

Die isobare Markierungsstrategie ermöglicht eine leistungsfähige Quantifizierung mit parallelem Multiplexing. Allerdings wurde festgestellt, dass es bei der Methode zu einer sogenannten *ratio-compression*, also eine Verzerrung der Mengenverhältnisse, kommt.^[52-54] Bei komplexen Protein-Mischungen tritt dieser Effekt besonders stark auf. Ursache der Verzerrung ist eine Ionen-Interferenz, das heißt die Koisolierung und Kofragmentierung nah-isobarer Peptid-Ionen zusammen mit dem Zielpeptid (Abbildung 12). Bei einem tatsächlichen Verhältnis von 2:1, nähert sich das gemessene Verhältnis einem ausgeglichenen 1:1, also einer Unterschätzung der Mengenverhältnisse, an. Das Resultat ist eine reduzierte Genauigkeit und Präzision der Peptidquantifizierung.

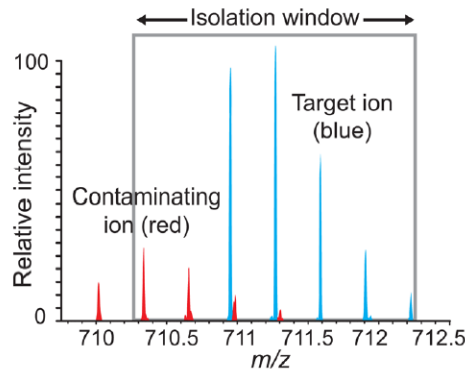


Abbildung 12 Reduzierte Genauigkeit und Präzision der Peptidquantifizierung durch *ratio-compression* Effekt. Koisolierung und Kofragmentierung nah-isobarer Ionen (rot) zusammen mit dem Ziel-Ion (blau).^[52]

Derzeit gibt es drei verschiedene Ansätze zur Bewältigung des *ratio-compression* Problems von TMT:

- 1) Protonen-Transfer-Ionen-Reaktion (PTR) von *Wenger et al.*^[53]
- 2) MS³ Methode nach *Ting et al.*^[52]
- 3) TMT^c Methode nach *Wühr et al.*^[54]

Bei der 2011 veröffentlichten Methode der Protonen-Transfer-Ionen-Reaktion (PTR), wird der Ladungszustand des Vorläuferpeptids mittels Protonentransfer reduziert. In einem zusätzlichen Isolierungsschritt können störende Ionen mit unterschiedlichen Ladungszuständen entfernt werden. Bei der MS³-Methode nach *Ting et al.* wird das intensivste Signal im MS² Scan reisoliert und erneut fragmentiert. Die resultierenden *Reporter* Ionen im MS³ Scan stammen fast ausschließlich vom Zilopeptid. Beide Methoden können zwar den Verzerrungseffekt verringern, verschlechtern jedoch gleichzeitig die Nachweisempfindlichkeit sowie die Erfassungsgeschwindigkeit. Zudem können die Methoden nur auf limitierten Geräten durchgeführt werden. Eine genaue Quantifizierung von TMT-markierten Peptiden auf MS²-Ebene ohne zusätzliche Ionen Reinigung, also einem zusätzlichen Isolierungsschritt, wurde 2012 von *Wühr et al.* veröffentlicht. Die sogenannte TMT^c Methode basiert auf der Quantifizierung von sogenannten komplementären Ionen-*clustern*.^[54] Ein komplementäres Ionen-Cluster entsteht als Rest nach der Abspaltung des *Reporters*. Abbildung 13 zeigt die Fragmentierung eines TMT-markierten Peptids in *Reporter* und komplementäres Peptid-Fragment-Ion. Da die TMT^c-Ionen den Großteil des *Balancers* tragen, enthalten sie ebenfalls Informationen über die relativen Unterschiede der markierten Peptide. Ko-eluierende Peptid-Ionen haben keinen Einfluss auf das TMT^c Cluster. Im Gegensatz zum PTR oder MS³-Ansatz kann die TMT^c Methode auf einer Vielzahl an Geräten gemessen werden. Die Methode ist durch die geringe Spaltungseffizienz von TMT im Massenspektrometer limitiert. Zudem sind die TMT^c Cluster von TMT-130 und TMT-129 nicht unterscheidbar, da die Markierung sich am Carbonylkohlenstoff befindet und somit während der Spaltung verloren geht. Die TMT^c Methode scheint eine vielversprechende Methode zur Überwindung des *ratio-compression*

Einleitung

Problems. Sie verlangt jedoch die Entwicklung neuer isobarer Reagenzien, die effizienter in der Masse spalten und welche die gleichen quantitativen Informationen im TMT^c Cluster tragen wie im *Reporter*.

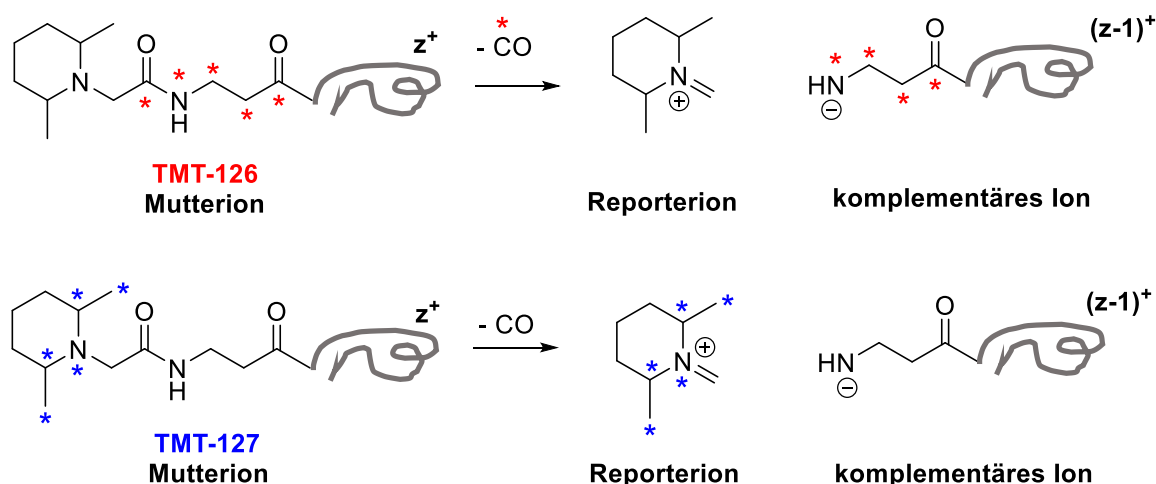


Abbildung 13 Exemplarische Darstellung einer TMT^c-Cluster Entstehung anhand eines TMT-126 und eines TMT-131-markierten Peptides (grau). Die Peptid-Mutterionen des MS¹-Scans werden isoliert und im Massenspektrometer gespalten. Das TMT Reagenz fragmentiert an zwei Stellen im Molekül - durch gestrichelte Linien dargestellt. Das MS²-Spektrum enthält sowohl *Reporter*-Ionen als auch komplementäre Ionen, welche den Großteil des *Balancers* tragen.

Da jeder Analyt eine unterschiedliche MS-Signalantwort gibt, ist die Bestimmung absoluter Mengen biologischer Proben nicht über die drei bisher genannten Quantifizierungsmethoden möglich. Die metabolische Markierung, die chemische Markierung sowie die markierungsfreie Methode bestimmen alle relative Proteinmengen. Eine absolute Proteinquantifizierung wird in der Regel durch den Vergleich von MS-Signalintensitäten mit dem eines Isotopenstandards erreicht.^[55-59] Da die Generierung der benötigten Standards jedoch aufwändig ist, wird diese Methode nur für zielgerichtete Projekte eingesetzt. Aufgrund der beobachteten Korrelation zwischen der Anzahl identifizierter Peptide eines Proteins und der Proteinabundanz,^[34] wird untersucht ob eine absolute Quantifizierung auch über die markierungsfreie Methode möglich ist.^[60-62] Da sich diese Arbeit mit der Entwicklung neuer isobarer Markierungsreagenzien zum Vergleich von Proteinmengen beschäftigt, wird nicht näher auf Methoden absoluter Quantifizierung eingegangen. Nach der Abhandlung von Methoden zur Quantifizierung, wird im folgenden Abschnitt näher auf die Eigenschaften von Derivatisierungsreagenzien eingegangen.

1.4 Allgemeine Eigenschaften von Derivatisierungsreagenzien für LC/ESI-MS/MS Anwendungen

Zwei unterschiedliche Wege können zu einer Leistungssteigerung in der massenspektrometrischen Analyse führen, eine Optimierung der Geräteparameter oder die Veränderung der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Analyten. Zweiteres kann durch Derivatisierung des Analyten erreicht werden. Im folgenden Kapitel soll näher auf

spezielle Eigenschaften von Derivatisierungsreagenzien eingegangen werden, die für LS-ESI-MS/MS Anwendungen entwickelt wurden (Beschreibung eines MS/MS-Experimentes siehe 1.3.3, Abbildung 6). Der Fokus liegt hierbei nicht nur auf den beschriebenen proteomischen Reagenzien, da sich die Arbeit auch mit Reagenzien zur Sensitivitätssteigerung schwer im Elektrospray ionisierbaren Analyten beschäftigt. Die sorgfältige Wahl der Reaktivgruppe in Kombination mit geeigneten Reaktionsbedingungen ist die Basis einer vollständigen Derivatisierung. Daher wird in Abschnitt 1.5 auf die Funktionalität zur stabilen Derivatisierung des Analyten eingegangen. Neben der Wahl einer geeigneten Reaktivgruppe, soll die Derivatisierung auch zu einer besseren Sichtbarkeit im Massenspektrometer beitragen. Die Sensitivität ist von der Ionisierbarkeit des Analyten abhängig.^[63] Schwer ionisierbare Analyten kann man beispielsweise durch Einführung funktioneller Gruppen^[64-65], die permanente Ladungen^[66-70] oder protonenaffine Gruppen tragen^[71-72], im ESI-MS-Experiment besser sichtbar machen. (siehe Abschnitt 1.7).^[64] Die gute Sichtbarkeit des Analyten kann jedoch nicht die Peak-Überlappung nah-isobarer unspezifischer Ionen im MS¹-Scan kompensieren. Für die zielgerichtete Analyse von Analyten komplexer Proben ist daher eine massenspaltbare Gruppe zur Detektion eines signifikanten Fragmentierungsmusters (SRM, *selected reaction monitoring*) wünschenswert.^[73-74] SRM ist eine MS/MS-basierte Methode zur zielgerichteten exakten Quantifizierung. Wie unter 1.3.3 beschrieben (Abbildung 6), findet im MS/MS-Experiment ein zusätzlicher Isolierungs- und Fragmentierungsschritt statt. Aus dem resultierenden Produkt-Ionen-Spektrum (MS²) kann die Struktur des Vorläufers eindeutig abgeleitet werden. Durch die MS/MS-Detektion kann das S/N-Verhältnis verbessert werden („Ionen-Reinigung“) und somit die Sensitivität der Methode erhöht werden. Für diesen CID-Prozess müssen die Derivate effizient fragmentieren und intensive Produkt-Ionen bilden. Dies kann durch den Einbau massenspaltbarer Gruppen verwirklicht werden (1.6).^[75]

1.5 Chemische Reaktivität von Derivatisierungsreagenzien

Bei der chemischen Markierung von Biomolekülen, egal ob bei der isobaren oder sensitivitätssteigernden Markierung, soll eine vollständige Derivatisierung erreicht werden. Aus chemischer Sicht soll ein Reagenz daher eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem Analyten aufweisen. Abbildung 14 gibt einen Überblick über gängige Reaktivgruppen. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Protein-Markierung sowie der gezielten Markierung von Molekülen mit Carbonylgruppen, daher wir in diesem Kapitel insbesondere auf diese Themen eingegangen. Als Markierungsstelle von Proteinen, dienen insbesondere die Aminosäure-Seitenketten mit nukleophilen Funktionalitäten, wie zum Beispiel Cystein, Lysin, Arginin, Histidin und Tyrosin (siehe Abbildung 15). Auch Aminosäuren mit Säurefunktionalität, wie Asparagin- und Glutaminsäure, können modifiziert werden. Säuregruppen müssen jedoch zunächst aktiviert werden. Auch die chemische Markierung des C- und N-Terminus von Proteinen ist denkbar. Da viele der natürlichen Aminosäuren nukleophile funktionelle Gruppen

Einleitung

besitzen, die mit den verschiedenen Derivatisierungsreagenzien reagieren können, ist eine chemoselektive Modifizierung jedoch erschwert. Diese kann jedoch durch sorgfältige Wahl der Reaktivgruppe in Kombination mit geeigneten Reaktionsbedingungen erreicht werden.

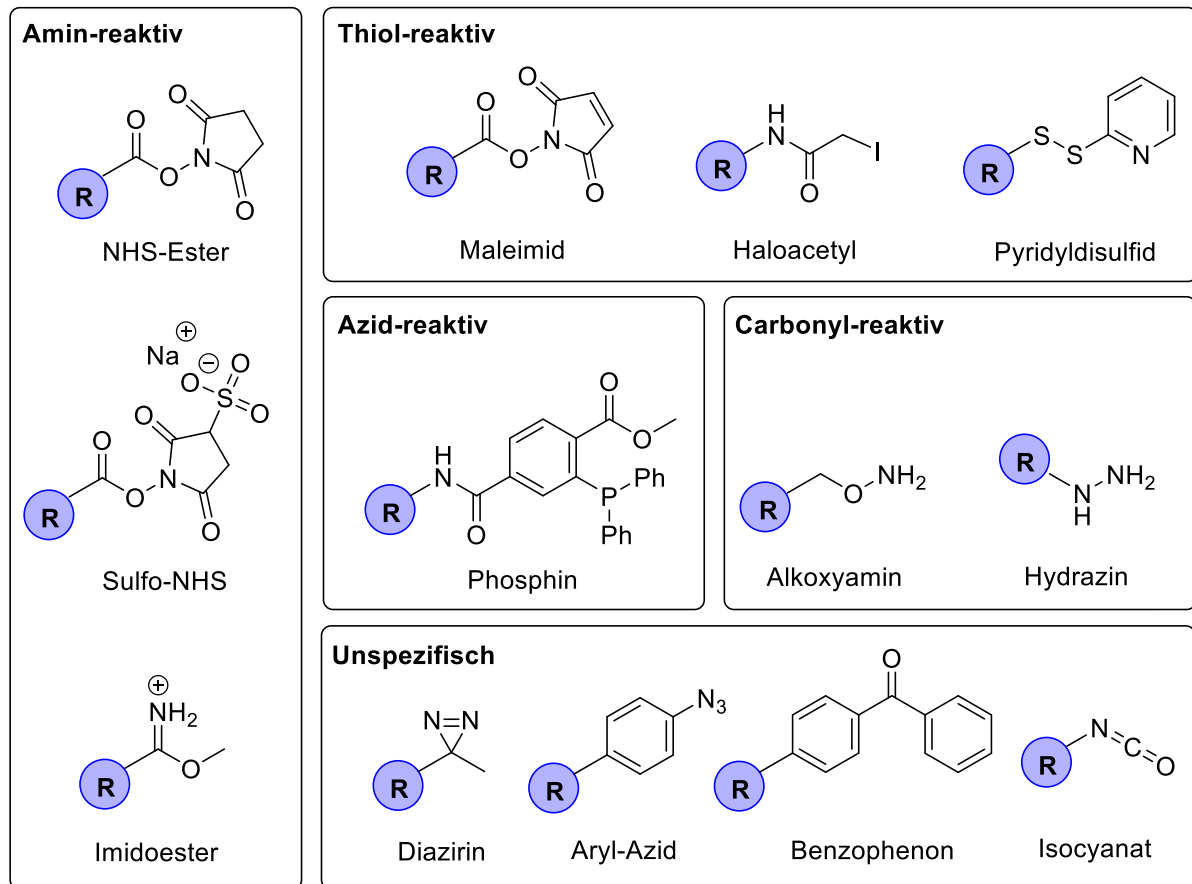


Abbildung 14 Klassifizierung gängiger Reaktivgruppen nach funktionellen Gruppen des Zielmoleküls.

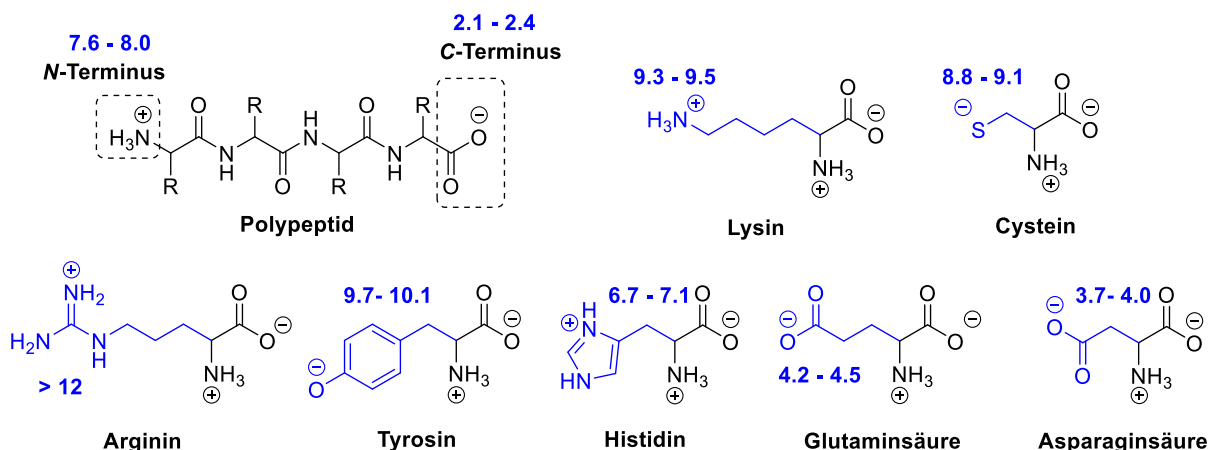


Abbildung 15 Zur Proteinmodifizierung eignen sich am besten Aminosäuren mit ionisierbaren Seitenketten (blau), sowie C- und N-Terminus des Polypeptides. Die pKa-Werte stehen in blau über den jeweiligen Gruppen.^[76] Die Abbildung zeigt die geladenen Zustände der Seitenketten. Abhängig vom pKa und pH-Wert nehmen sie die ungeladene Form ein.

Auch die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppe ist essentiell für die Proteinmodifizierung. Um die Menge an Protein genau bestimmen zu können, sollte jedes Protein nach der Markierung die Modifizierung tragen. Aminosäuren, die im gefalteten Proteinkern liegen und

somit schlecht erreichbar sind, eignen sich daher nicht als Modifizierungsstelle. Lysine sind für die Proteinmodifizierung leicht zugänglich, da die ϵ -Aminogruppe ($pK_a = 9.3 - 9.5$)^[76] in der Seitenkette unter physiologischen Bedingungen positiv geladen und daher auf der Proteinoberfläche nach Außen gerichtet ist. Neben der ϵ -Aminogruppe sind am *N*-Terminus ($pK_a = 7.6 - 8.0$) jeder Polypeptidkette primäre Amine vorhanden. Aus diesem Grund adressieren viele gängige Derivatisierungsreagenzien Aminogruppen. Am Beispiel Cystein lässt sich die Bedeutung der Zugänglichkeit für die Modifizierung im Protein verdeutlichen. Auch die Thiolgruppe am Cystein wäre für die Derivatisierung von Proteinen denkbar. Das polarisierbare Thiolat ist deutlich nukleophiler als die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Da Cysteine im Protein jedoch meist in oxidiert Form als Disulfidbrücken vorliegen, sind sie nicht so gut für Modifizierungen zugänglich wie die primären Amine der Lysine. Im folgenden Abschnitt 1.5.1 wird daher genauer auf Amine als Modifizierungsstelle sowie gängigen Amin-reaktive Gruppen eingegangen.

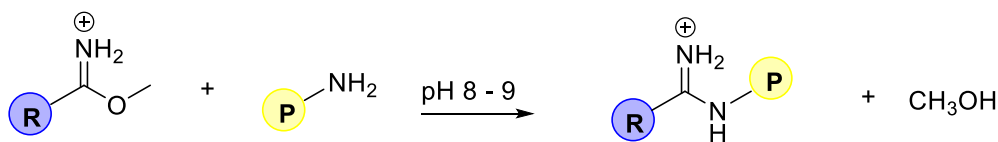
1.5.1 Amin-reaktive Gruppen zur Proteinmodifizierung

Amin-reaktive Reagenzien werden am häufigsten zur Modifizierung von Proteinen, Peptiden, und anderen Biomolekülen eingesetzt. Die leicht basische ϵ -Aminogruppe ($pK_a = 9.3 - 9.5$)^[76] von Lysin (Abbildung 15) reagiert mit den meisten Acylierungs-Reagenzien. Die am häufigsten verwendeten Amin-reaktiven Gruppen sind *N*-Hydroxysuccinimid Ester (NHS-Ester) und Imidoester. Die Reaktivität eines Amins ist jedoch stark pH abhängig. Unter pH = 8.0 ist die Konzentration der freien Base sehr gering. Ein pH-Wert von 8.5 bis 9.5 ist optimal für die Modifizierung von Lysinresten.^[76] Da einige Acylierungsreagenzien jedoch bei höheren pH-Werten hydrolysiert werden, sollte die Proteinmodifizierung bei etwas niedrigeren pH-Werten zwischen pH = 7.0 und pH = 8.5 durchgeführt werden. Unter diesen Reaktionsbedingungen reagieren Acylierungsreagenzien in der Regel nicht mit der Amidgruppe der Peptidbindungen und den Seitenketten-Amiden der Glutamin- und Asparaginreste, der Guanidiniumgruppe des Arginins sowie der Imidazoliumgruppe des Histidins (siehe Abbildung 15).

1.5.1.1 Imidoester

Die elektrophilen Imidoester reagieren bei pH = 8 – 9 schnell mit den Aminen zu Amidinen (Schema 1). Allerdings hydrolysieren sie auch schnell zu Estern und diese weiter zu Säure und Alkohol. Zudem werden bei der Reaktion mit Imidoestern viele Nebenreaktionen beobachtet. Bei niedrigeren pH-Werten werden die Imidoester deprotoniert und tautomerisieren (Amidat/Imidat-Ionen). Mit Alkoholen werden Orthoester gebildet. Daher werden in der Praxis bevorzugt die stabileren und effizienteren NHS-Ester verwendet.

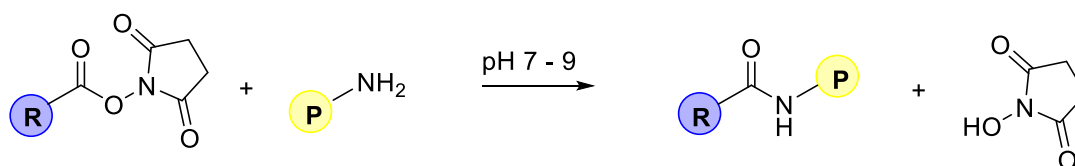
Einleitung



Schema 1 Chemische Konjugation von Imidoestern mit primären Aminen. (R) stellt das Derivatisierungsreagenz dar; (P) repräsentiert ein Protein oder einen anderen Analyten.

1.5.1.2 Aktivester

Aktivester sind aktivierte Carbonsäuren, die unter leicht alkalischen Bedingungen mit den primären Aminen zu stabilen Amiden reagieren. Bei der Reaktion von *N*-Hydrosuccinimid-Ester (NHS-Ester) mit primären Aminen (Schema 2) entsteht *N*-Hydrosuccinimid als Nebenprodukt, das leicht durch Dialyse oder Entsalzung entfernt werden kann.



Schema 2 Chemische Konjugation von NHS-Estern mit Primären Aminen. (R) stellt das Derivatisierungsreagenz dar; (P) repräsentiert ein Protein oder einen anderen Analyten.

Die Hydrolyseempfindlichkeit der NHS-Ester ist der limitierende Faktor der Amidierung und somit einer vollständigen Umsetzung. Die Hydrolysegeschwindigkeit steigt mit dem pH-Wert des Puffers und trägt zu einer geringeren Effizienz bei. Die Halbwertszeit der Hydrolyse für NHS-Ester beträgt 4 bis 5 Stunden bei pH = 7.0 und 0 °C (Lomant and Fairbanks, 1976).^[77] Diese Halbwertszeit sinkt auf 10 Minuten bei pH = 8.6 und 4 °C.^[78] Durch eine hohe Reagenz-Konzentration kann die Modifizierung verbessert werden. Bei großem Reagenzüberschuss und langen Reaktionszeiten kann es jedoch zur Nebenreaktion mit Alkoholen und Thiolen kommen. Auf Grund der erwähnten Hydrolyseempfindlichkeit und allgemeinen Reaktionsfreudigkeit von Aktivestern, bietet es sich an, die Reagenzien in Form der freien Säure zu lagern und erst *in situ* in den Aktivester umzuwandeln. Neben dem gängigen NHS-Esters stehen auch anderer Aktivester, wie der reaktivere Pentafluorphenylester (PFP),^[79] für die Amin-Derivatisierung zur Verfügung (Abbildung 16). Sulfonierte NHS-Ester, wie 4-Sulfotetrafluorphenyl-Ester (TFP)^[80] oder Sulfo-Dichlorphenyl-Ester (SDP), sind besser wasserlöslich. Auf Grund ihrer Polarität erreichen sie jedoch einige Amine nicht, die in hydrophoben Proteinregionen liegen.

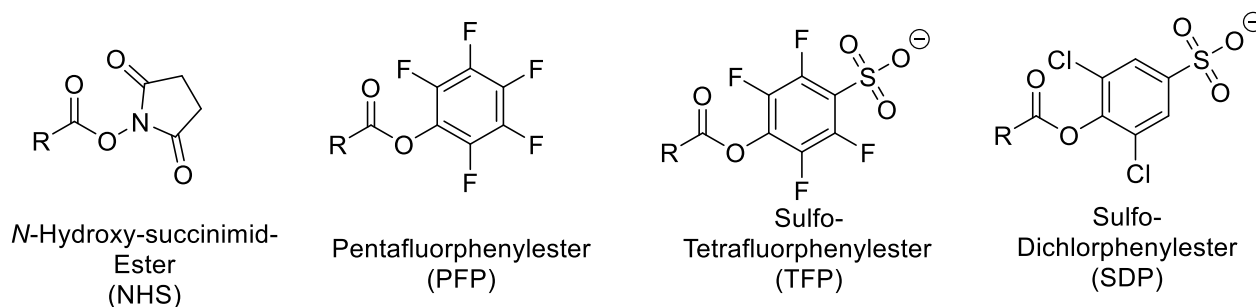


Abbildung 16 Gängige Aktivester für die Derivatisierung von Aminen.

1.5.2 Carbonyl-Reaktive Gruppen zur Modifizierung von Keto-Analyten

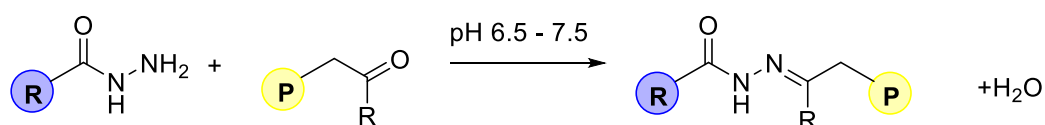
Neben der Markierung von Proteinen liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Modifizierung von Analyten, die eine Carbonylgruppe enthalten. Eine Reihe niedermolekularer Stoffe wie Steroidhormone, reduzierende Zucker und Stoffwechselzwischenprodukte, wie Pyruvat und α -Ketoglutarat, enthalten Aldehyd- und Keton-Funktionalitäten. Auch bei der Quantifizierung abasischer Stellen im Genom wird die Aldehyd-Funktionalität der Zuckers modifiziert.^[74] Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Modifizierung von Carbonylverbindungen sind:

- Hydrazin und Hydrazin-Derivate (1.5.2.1)
- Alkoxyamin-Derivate (1.5.2.2)
- *Schiff*-Basen mit Aminen
- Reduktive Aminierungsreaktionen
- *Mannich* Kondensation

Als Reaktivgruppe für Derivatisierungsreagenzien sind insbesondere Hydrazine und Alkoxyamine interessant. Daher wird im folgenden Abschnitt näher auf diese funktionellen Gruppen eingegangen.

1.5.2.1 Hydrazin Derivate

Hydrazin-Derivate reagieren mit Carbonylverbindungen in einer Kondensationsreaktion zu relativ stabilen Hydrazonen. Die von Aldehyden stammenden Hydrazone werden schneller gebildet, sind jedoch instabiler als die Hydrazone der Ketone. Für die meisten Anwendungen ist die Bindung eines Hydrazons stabil genug. Sonst kann das Addukt reaktiv mittels Cyanoborhydrid oder Natriumborhydrid reduziert werden, um eine stabile kovalente Bindung zu erhalten. Die Reaktionsgeschwindigkeit und der Umsatz der Hydrason-Bildung kann durch Katalyse mit Anilin-Derivaten wesentlich verbessert werden.^[81]

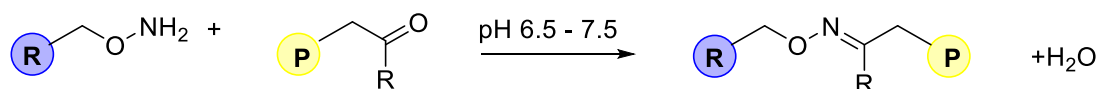


Schema 3 Kondensation von Hydraziden mit Carbonylverbindungen (R) stellt das Derivatisierungsreagenz dar; (P) repräsentiert ein Protein oder einen anderen Analyten.

Hydrazin-basierte Reagenzien die in der Spurenanalytik zur Signalverstärkung eingesetzt werden, sind unter 1.7 beschrieben.

1.5.2.2 Hydroxylamin Derivate (Alkoxyamine)

Die Alkoxyamin-Gruppe besitzt eine terminale Aminogruppe direkt neben einem Sauerstoffatom (-ONH₂). Alkoxyamine reagieren säurekatalysiert mit Carbonylverbindungen zu Oximen. Diese Oxime sind den Hydrazonen und Iminen hinsichtlich Ihrer Stabilität überlegen (N–O > C–N > N–N).^[82] Auch die Oximligation kann durch Anilin katalysiert werden.



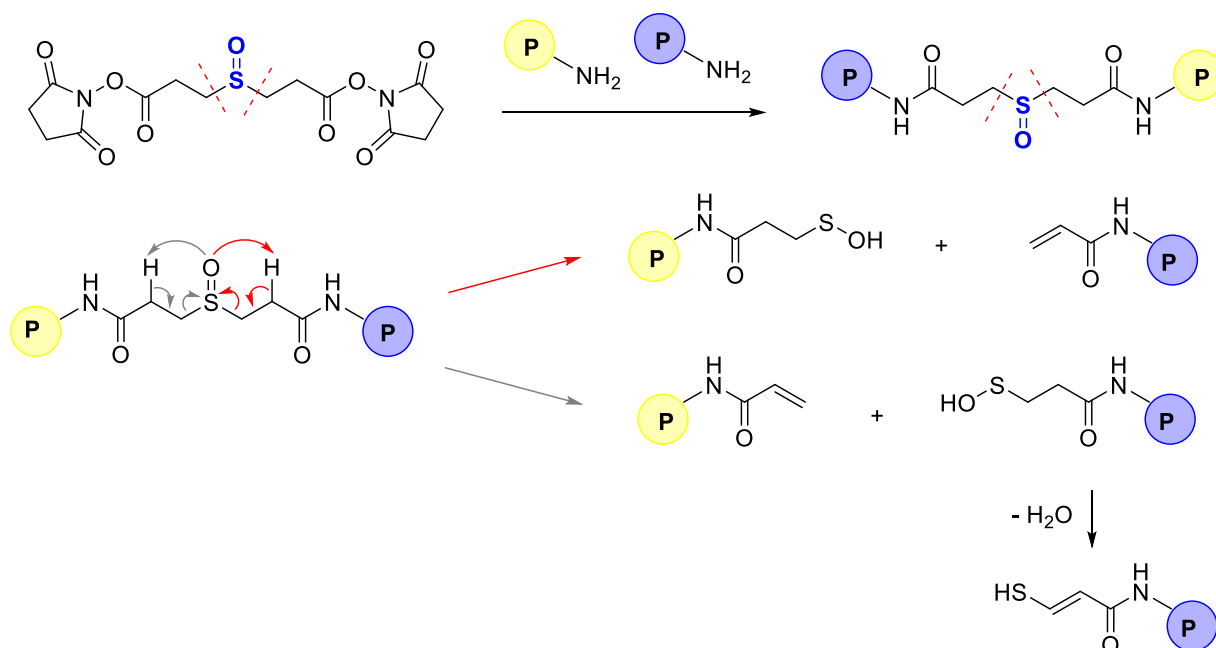
Schema 4 Oximligation von Alkoxyaminen mit primären Carbonylverbindungen. (R) stellt das Derivatisierungsreagenz dar; (P) repräsentiert ein Protein oder einen anderen Analyten.

Im Abschnitt 1.7 wird näher auf Hydroxylamin-basierte Reagenzien eingegangen, die in der Spurenanalytik zur Signalverstärkung eingesetzt werden.

1.6 Massenspaltbare Reagenzien

Wie unter 1.4 beschrieben, ermöglicht der Einbau einer massenspaltbaren Gruppe die Entstehung spezifischer Produktionen im MS²-Scan, welche eine eindeutige Identifizierung erleichtern. Diese massenspaltbare Gruppe kann durch den Einbau einer labilen Bindung im Reagenz realisiert werden, welche im Massenspektrometer bei Kollision mit einem Stoßgas leicht gespalten wird. Am besten eignen sich Bindungen mit niedriger Bindungsdissoziationsenergie, wie Gruppen/Atome die Radikale gut stabilisieren können. Bei der Derivatisierung von Proteinen und Peptiden ist zu beachten, dass die Fragmentierungsstelle bei geringerer Energie spalten soll als die Amidbindungen des Peptid-Rückgrates. Sie soll jedoch auch nicht zu instabil sein und zum spontanen Zerfall neigen. Die Strategie der MS-Spaltbarkeit wird bisher am häufigsten in der *Cross-Linker* Technologie eingesetzt. Inspiriert von diesen Strukturen werden auch MS-spaltbare Reagenzien für andere Anwendungen entwickelt. Vernetzungsreagenzien dienen zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die beispielsweise zur Strukturaufklärung von Proteinkomplexen eingesetzt werden. So wurde 2018 von *Heck et al.* das Interaktom intakter Mitochondrien untersucht^[83] oder Histon-Interaktionen visualisiert^[83]. Der bekannteste Vertreter dieser vernetzenden Reagenzien ist das sulfoxidbasierte Disuccinimidylsulfoxid (DSSO).^[75] Eine Sulfoxidfragmentierung findet normalerweise bei hohen Temperaturen statt. In der Kollisionskammer des Massenspektrometers erfolgt sie jedoch bereits bei geringer Energie.

Einleitung



Schema 5 MS-Spaltung des *Cross-Linkers* DSSO. Nach Vernetzung zweier Peptide (gelb und blau) erfolgt die MS-induzierte symmetrischen Spaltung an zwei Stellen - durch gestrichelte rote Linie dargestellt. In der Sulfoxidfragmentierung werden 4 Fragmente gebildet, zwei Alken-Fragmente (α) und zwei Sulfensäure-Fragmente (β). Aus dem β-Fragment kann noch Wasser eliminiert werden.

Auf Grund der symmetrischen Struktur von DSSO, fragmentiert der *Cross-Linker* im Massenspektrometer an zwei Stellen, somit werden 4 Fragmente gebildet (Schema 5). Die β-H-Atom Eliminierung erfolgt über einen fünf gliedrigen Übergangszustand. Die Reaktion liefert zwei Alken-Fragmente (α) und zwei Sulfensäure Fragmente (β) zur Peptidentifizierung. Aus den Sulfensäure Fragmenten kann noch Wasser eliminiert werden. Neben Sulfoxiden haben sich auch Sulfone, Disulfide, Ester, Amide, Harnstoff-Derivate sowie Thioharnstoff-Derivate, und quaternäre Alkylamine als funktionelle Gruppen bewährt (Abbildung 17).

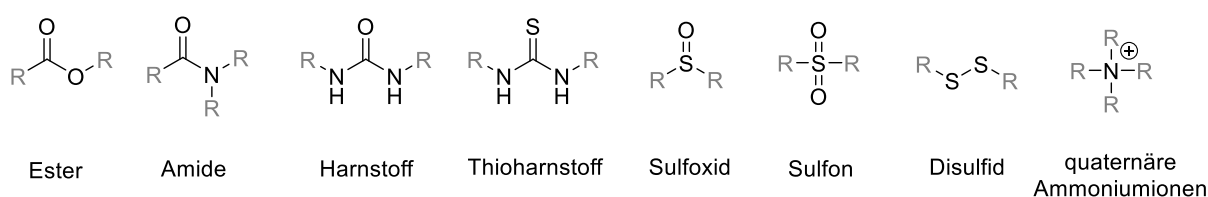


Abbildung 17 Bewährte massenspaltbare Gruppen.

Massenspaltbare Gruppen werden wie oben erwähnt, vor allem in *Cross-Linkern* gefunden. Daher wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Peptid-verknüpfender Reagenzien mit labilen Bindungen veröffentlicht. Ein kleiner Überblick über die Vielfalt dieser Peptid-Marker soll zur Entwicklung neuer massenspaltbarer Moleküle für andere massenspektrometrische Anwendungen inspirieren (Abbildung 18).

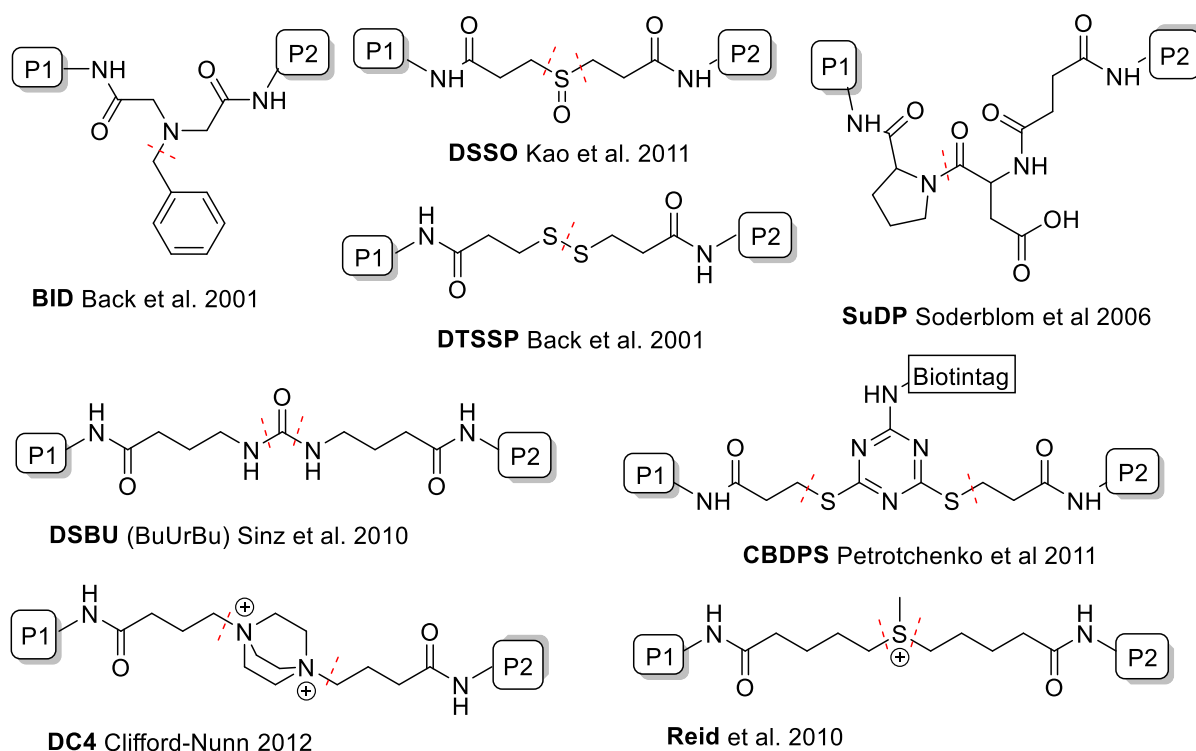


Abbildung 18 Auswahl massenspaltbarer *Crosslinking* Reagenzien.^[75, 84-91]

Massenspaltbare Gruppen werden mittlerweile auch in anderen massenspektrometrischen Reagenzien, wie isobaren Markern oder sensitivitätssteigernden Reagenzien gefunden. In diesem Zusammenhang sollte das unter Abschnitt 1.3.3.2 beschriebene TMT-Reagenz erwähnt werden. Im Abschnitt 1.7 wird näher auf ein spaltbares Reagenz zur Detektion abasischer Stellen im Genom^[74] eingegangen.

1.7 Reagenzien zur Sensitivitätssteigerung

Die LC/ESI-MS/MS (siehe Abschnitt 1.3.3 und Abbildung 6) ist eine äußerst leistungsfähige Technologie zur Detektion und Quantifizierung im Spurenbereich. Jedoch können eine schlechte Ionisierungseffizienz, eine schwache Fragmentierung, Signalsuppressionen sowie hohes Hintergrundrauschen die Leistungsfähigkeit erheblich limitieren. Wie unter 1.4 erwähnt, kann die Sensitivität der Methode im Falle eines schlecht ionisierbaren Analyten durch chemische Derivatisierung erhöht werden. Neben der Ionisierungseffizienz können auch das chromatographische Verhalten oder die Fragmentierungseigenschaften des Analyten verändert werden, indem man die chemischen und physikalischen Eigenschaften optimiert. Zur Steigerung der Sensitivität schwer ionisierbarer Analyten kann man entweder ionisierbare Gruppen einführen oder eine permanente Ladung ins Molekül einbauen. Permanente Ladungen führen zu einer stärkeren Signalsteigerung, da der Analyt nicht mehr ionisiert werden muss. Sie haben jedoch den Nachteil, dass sie eine chromatographische Auftrennung erschweren. Eine Steigerung der Hydrophobizität ist besser für die Tröpfchenbildung im ESI-Spray, sowie einer späteren Retentionszeit bei der Umkerphasen-Chromatographie. Daher ist

Einleitung

die Kombination aus permanenter Ladung sowie hydrophober Gruppe perfekt für das Design eines Derivatisierungsreagenz. Zur Steigerung der Hydrophobizität werden in der Regel Aromaten in die Struktur integriert. Als permanente Ladungen haben sich quaternäre Ammonium Ionen, Pyridinium Gruppen oder Phosphonium Reste bewährt.

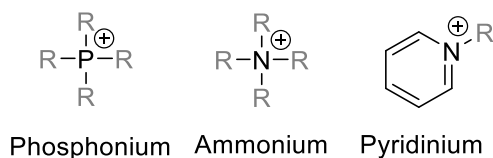


Abbildung 19 Auswahl funktioneller Gruppen mit permanenter Ladung zur Sensitivitätssteigerung in Derivatisierungsreagenzien.

Für die Derivatisierung von Aldehyden und Ketonen, steht eine Reihe an Reaktivgruppen zur Verfügung (siehe 1.5.2). Früher wurden vor allem Hydrazin-basierte Reagenzien, wie Dansylhydrazin,^[72] das Pyridinium-basierte Girard's P^[68] und das Girard's T Reagenz^[70, 92] in der Spurenanalytik eingesetzt. Aufgrund der Labilität der entstehenden Semicarbazone, haben diese jedoch an Bedeutung verloren. Mittlerweile hat sich das 2012 erstmals veröffentlichte *Amplifex*® Reagenz von *Star-Weinstock et al.* als Standard für die Derivatisierung von Carbonylverbindungen durchgesetzt.^[66, 93] Das Reagenz ist ein Hydroxylamin-Derivat, das wie *Girard T* eine permanent geladene Trimethylammonium-Gruppe trägt.

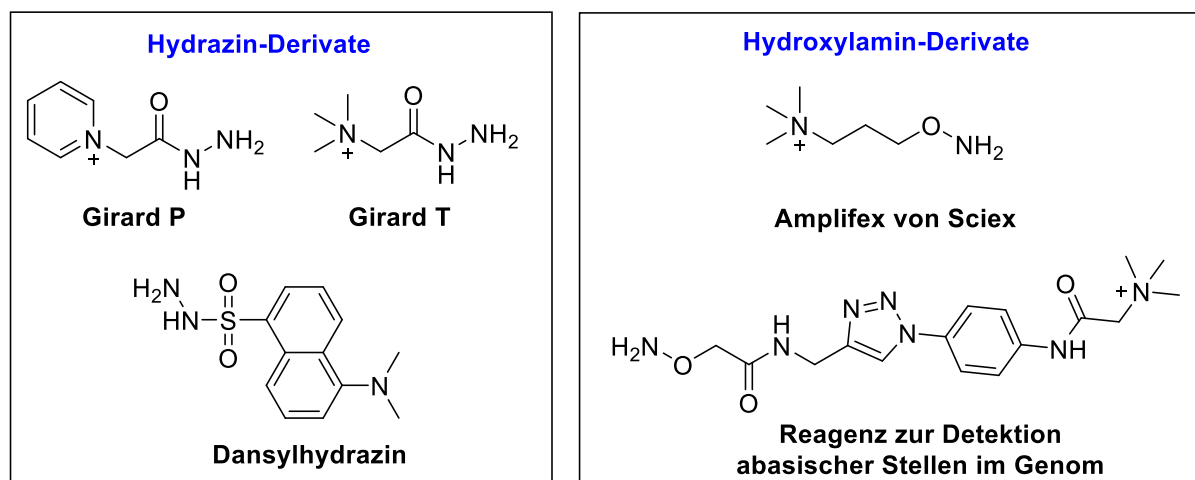


Abbildung 20 Eine Auswahl gängiger Amin/Keton-reaktiver Derivatisierungsreagenzien.

Eine Neuheit stellt das im Jahr 2017 von der *Carell*-Gruppe veröffentlichte Reagenz zur Detektion abasischer Stellen dar, welche unter anderem während der Basen-Exzisionsreparatur und der epigenetischen Reprogrammierung im Genom entstehen.^[74] Das Reagenz vereint sowohl die Eigenschaften der Signalsteigerung durch eine permanente Ladung, einer gesteigerten Hydrophobizität durch den Aromaten, als auch der Massenspaltbarkeit für die Entstehung intensiver Produkt-Ionen für die LC/ESI-MS/MS Analytik. Das „Hintergrundrauschen“ im Spektrum wird durch die MS/MS-Detektion verbessert. Eine Überarbeitung des Reagenzdesigns könnte die Sensitivität der Methode möglicherweise noch weiter steigern. Insbesondere der Einbau anderer massenspaltbarer Gruppen in das

Einleitung

Reagenz könnte die Spaltungseffizienz des Reagenzes verbessern und somit eine empfindliche Erkennung des gewünschten Zielanalyten ermöglichen.

2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollten zwei neue Derivatisierungsreagenzien für Massenspektrometrie-basierte Studien entwickelt werden: Ein neues isobares Markierungsreagenz für die Quantifizierung von Proteinen sowie ein sensitivitätssteigerndes Keton/Aldehyd-reaktives Reagenz für die Spurenanalytik.

2.1 Entwicklung eines neuen isobaren Markierungsreagenz

Die quantitative Proteomik vergleicht massenspektrometrisch Veränderungen der relativen Häufigkeit von Proteinen in verschiedenen biologischen Proben. In komplexen Proben erfolgt die Protein-Quantifizierung üblicherweise über chemische isobare Markierung. Gängige isobare Reagenzien haben jedoch noch Verbesserungsbedarf hinsichtlich Sensitivität und Präzision. Durch Entwicklung neuer Reagenzien kann eine zuverlässige Proteinquantifizierung ermöglicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein neues isobares Markierungsreagenz entwickelt werden, das effizienter spaltet als derzeitige verwendete Reagenzien. Somit sollte insbesondere die Generierung intensiver Komplementärionen gefördert werden, um eine Analyse über Komplementär-Ionen-Cluster zu ermöglichen. Dadurch erhoffen wir uns den Effekt der *ratio-compression*, eine Verzerrung der gemessenen Mengenverhältnisse, zu verbessern. Ein erster Entwurf eines solchen isobaren Derivatisierungsreagenz wurde von *Michael Stadlmeier* entwickelt und erstmals unmarkiert von *Jana Bogena* synthetisiert. Für die Evaluierung des Reagenzes hinsichtlich der Quantifizierung von Proteinen, sowie dem Einfluss auf den Verhältnis-Verzerrung-Effekt, sollte im Rahmen der Doktorarbeit ausgehen von der unmarkierten Syntheseroute eine isotoopenmarkierte Variante synthetisiert werden. Hierbei soll eine Verbesserung des Syntheseweges hinsichtlich Ausbeute und Reinheit erfolgen. Nach massenspektrometrischer Evaluierung des Reagenzes sollte schließlich eine Optimierung des Reagenz-Designs erfolgen.

2.2 Entwicklung eines neuen Keton/Aldehyd-reaktiven Reagenz zur Sensitivitätssteigerung

Neben der Entwicklung eines neuen isobaren Markierungsreagenz zur Quantifizierung von Proteinen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neues Reagenz für die massenspektrometrische Spurenanalytik entwickelt werden. Derzeitig verwendete Reagenzien haben noch Verbesserungsbedarf hinsichtlich ihres Vermögens zur Sensitivitätssteigerung. Um eine empfindlichere Analyse schlecht ionisierbarer Keto-Gruppen enthaltender Analyten zu ermöglichen, sollte ein Hydroxylamin-basiertes Reagenz mit massenspaltbarer Sulfoxid-Gruppe entwickelt werden. Durch die massenspaltbare Gruppe sollen im Massenspektrometer intensive Tochterionen erzeugt werden. Hydroxylamin-Derivate bilden mit Ketonen und Aldehyden stabile Oxime. Für die Signalsteigerung des Zielanalyten, sollte das Reagenz eine

Aufgabenstellung

permanente Ladung tragen. Nach erfolgreicher Synthese sollte das neue Reagenz im Vergleich mit gängigen Derivatisierungsreagenzien am Beispiel des Testanalyten Testosteron hinsichtlich der Fragmentierungseigenschaften sowie der Fähigkeit zur Sensitivitätssteigerung verglichen werden.

3 Ergebnisteil

3.1 Entwurf und Synthese eines neuen sulfoxidbasierten isobaren Markierungsreagenz

3.1.1 Entwurf des neuen isobaren Markierungsreagenz

Die am häufigsten genutzte Quantifizierungsmethode ist die Markierung mit isobaren Reagenzien (siehe 1.3.3.2). Mit dieser Methode kann man sogar kleinste Unterschiede von Peptidmengen analysieren und mehrere verschiedene Proben in einer einzigen Messung vergleichen. Um eine exakte Peptid-Quantifizierung gewährleisten zu können, muss eine effiziente Spaltung des Derivatisierungsreagenz gewährleistet sein. In derzeitig verwendeten Reagenzien ist die Spaltungseffizienz nicht ausreichend.^[54] Daher wurde von uns ein neues sulfoxidbasiertes Derivatisierungsreagenz **1** (Abbildung 21) entwickelt, dass bei geringer Energie effizient spalten soll. In der folgenden Arbeit wird das Reagenz **1** als SOT-Tag (SulfOxid-Tag) Reagenz bezeichnet.

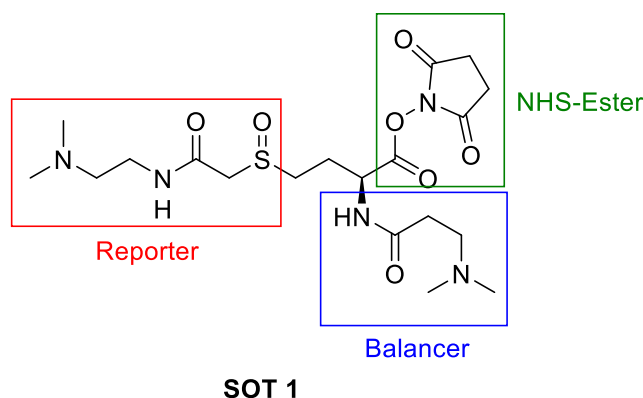


Abbildung 21 Entwurf des neuen isobaren Markierungsreagenz **1** – mit *Balancer*-Region, *Reporter*-Gruppe und Amin-reaktiver NHS-Ester Funktionalität.

Das in Abbildung 21 dargestellte Reagenz besitzt drei Funktionseinheiten:

- 1) Aminreaktive NHS-Ester-Funktionalität als Reaktivgruppe für die Reaktion mit dem Protein
- 2) Reportergruppe mit massenspaltbarer Sulfoxid-Gruppe, welche eine effiziente Spaltung bei niedriger Energie gewährleistet
- 3) Eine Balancer-Gruppe, welche die Massendifferenz ausgleicht die durch Isotopenmarkierung im Reporter entsteht

Wie im Abschnitt 1.5.1.2 beschrieben, eignen sich NHS-Ester ideal als Reaktivgruppe zur Proteinmodifizierung. Die aminreaktiven NHS-Ester reagieren bevorzugt mit ϵ -Aminogruppen von Lysinen sowie den Peptid *N*-Termini. Lysin ist die häufigste Aminosäure auf der Oberfläche von Proteinen. Somit kann durch Wahl dieser hoch reaktiven Gruppe eine effiziente Modifizierung von Proteinen gewährleistet werden. Sulfoxide fragmentieren unter HCD und CID Bedingungen bei niedrigerer Energie als Peptide (1.6). Der unter Punkt 1.6 beschriebene literaturbekannte *Cross-Linker* Dissuccinimidylsulfoxid (DSSO) diente als

Vorlage für das Design des neuen isobaren Markierungsreagenz. Die Sulfoxidfragmentierung kann nur bei Anwesenheit von β -H-Atomen erfolgen. Da im Design des Reagenzes nur auf einer Seite β -H-Atome vorgesehen sind, erfolgt die Fragmentierung selektiv an dieser Stelle. Die asymmetrische Spaltung generiert zwei Fragmentierungsprodukte. Somit wird die Datenkomplexität verringert und die Signalintensität der individuellen Fragmentationen erhöht. Das Reagenz trägt zwei basische *tert*-Aminogruppen, die in der Gasphase protoniert vorliegen. Durch diese protonierbaren Funktionalitäten, wird die Ladungsdichte erhöht und die Bildung einer neutralen Spezies während der Spaltung verhindert. Die erhöhte Ladungsdichte begünstigt die Sulfoxid-Fragmentierung weiter. Der Einbau polarer Gruppen erhöht auch die Wasserlöslichkeit des Reagenzes, was bei der Markierung von Proteinen sehr erstrebenswert ist. Mit der geplanten Struktur wäre prinzipiell die Einführung von bis zu acht schweren Isotopen unter Erhaltung der Isobarizität sowie der Entstehung von *Reporter*-Ionen mit $\Delta m/z = 1$ möglich. Mit diesem Neunplex wäre die parallele Quantifizierung von neun verschiedenen Proben in einer einzigen Messung möglich. Die theoretisch geplanten Strukturen eines solchen Neunplex sind in Abbildung 22 dargestellt.

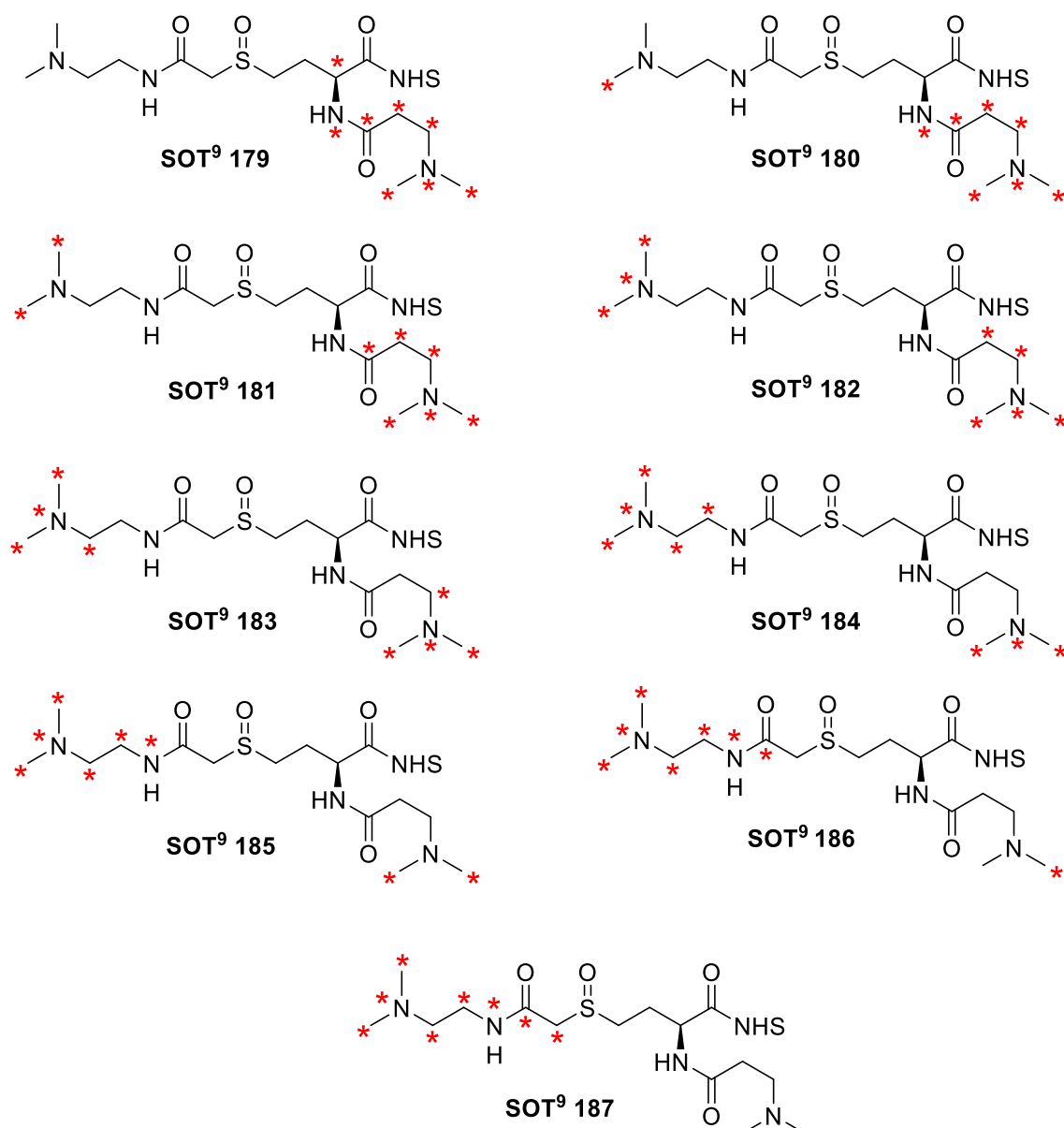


Abbildung 22 Theoretische geplante isotoopenmarkierte Strukturen der SOT-Reagenzien für den Neunplex.

3.1.2 Synthese einer ¹³C-markierten Version des neuen Derivatisierungsreagenz

Das neue isobare Derivatisierungsreagenz **1** wurde erstmals von JANA BOGENA dargestellt. Für die Quantifizierung von Proteinen verschiedener Proben mittels Tandem-Massenspektrometrie (LC/ESI-MS/MS siehe 1.3.3) benötigt man jedoch mindestens zwei isobare Reagenzien. Ein Reagenz trägt die Isotopenmarkierung in der *Reporter*-Region, das andere im *Balancer*. Beide Moleküle haben das gleiche Molekulargewicht. Bei der Sulfoxidfragmentierung im Massenspektrometer entstehen *Reporter*-Ionen mit unterschiedlichem Molekulargewicht. SOT² 179 **2** generiert *Reporter*-Ionen mit dem Molekulargewicht 179 Da und SOT² 180 **3** mit dem Molekulargewicht 180 Da (Abbildung 23).

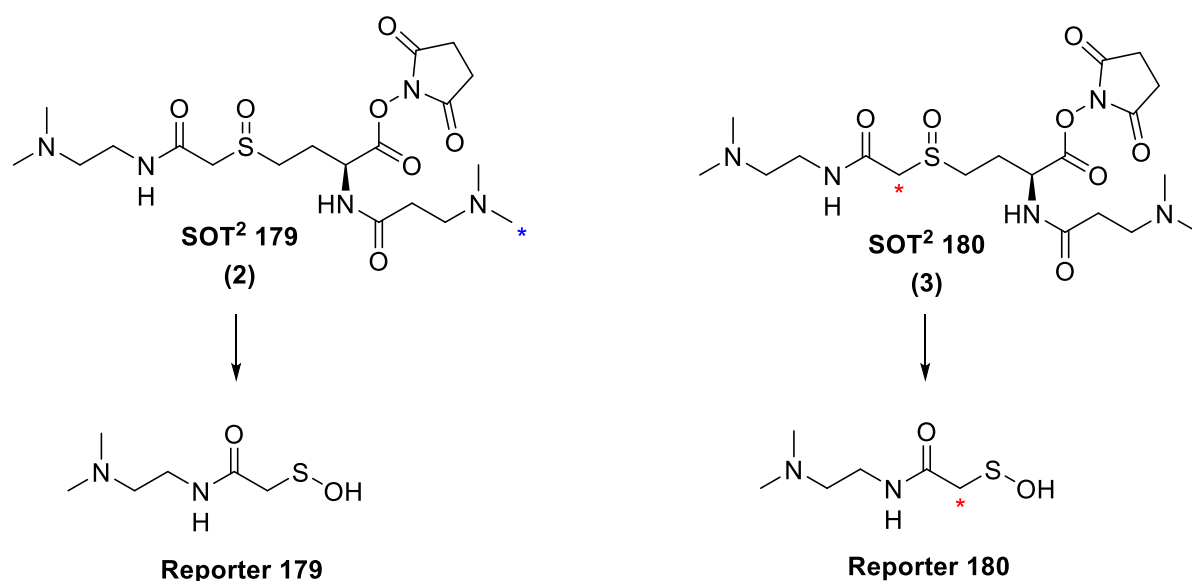
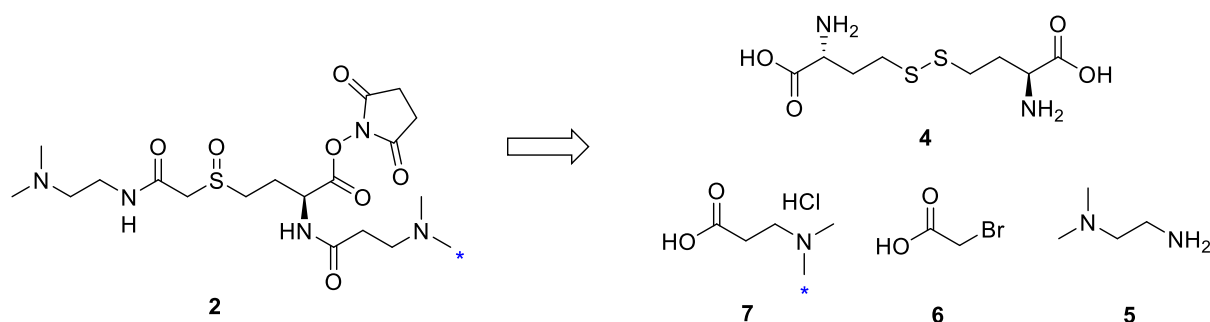


Abbildung 23 Duplex des neuen isobaren Markierungsreagenz, mit den Isotopologen **2** und **3**. 179 Da und 180 Da sind die Molekulargewichte der generierten *Reporter* Ionen.

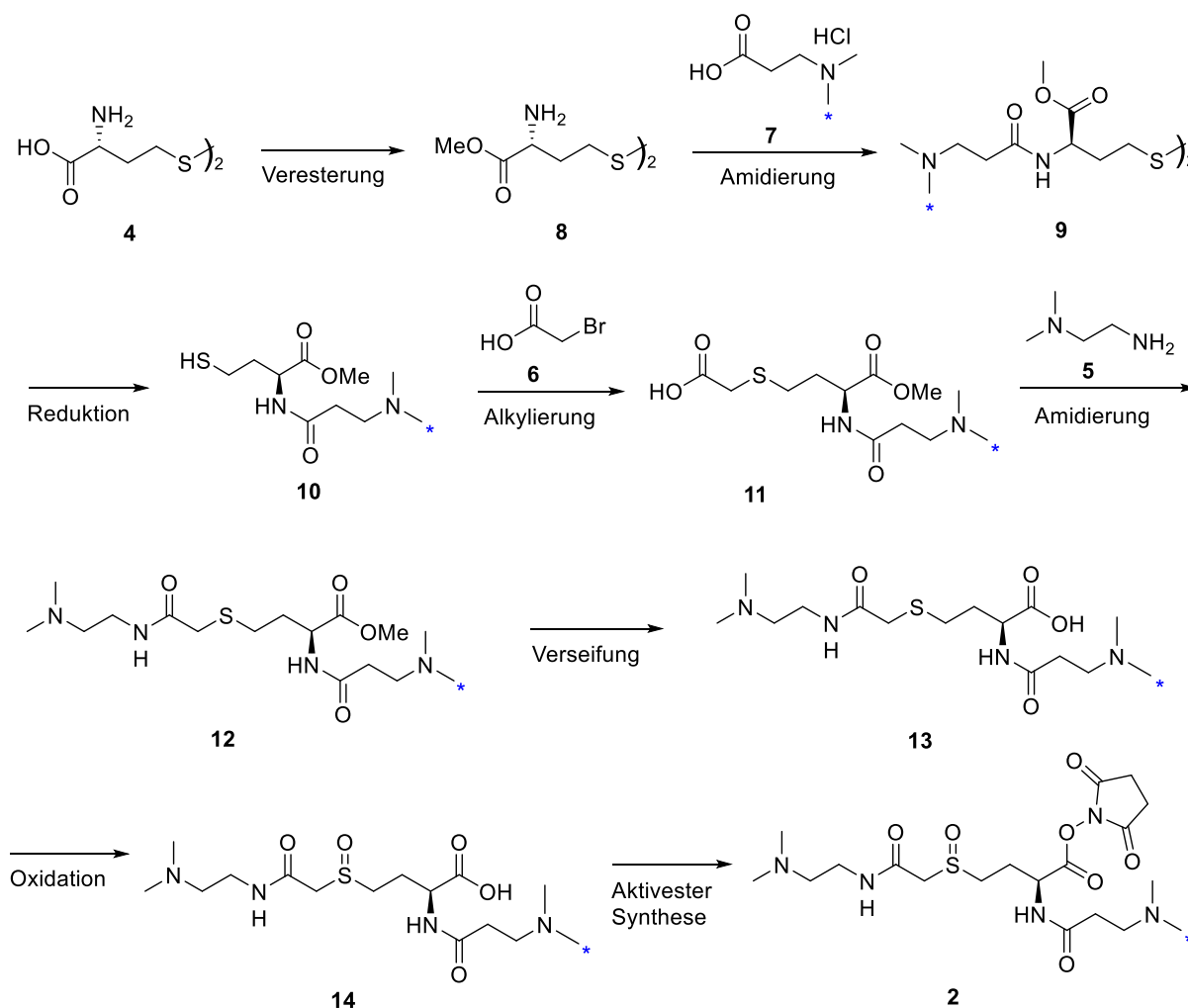
Zu Beginn der Arbeit war die Synthese des neuen unmarkierten isobaren Reagenz **1** sehr problematisch. Reinheit und Ausbeute waren nicht zufriedenstellend. Ausgehend von der etablierten Syntheseroute sollte die Darstellung der ^{13}C -markierten Variante SOT^2 179 **2**, mit Isotopenmarkierung in der *Balancer*-Region, erfolgen. Die isotopologe Struktur SOT^2 180 **3**, mit ^{13}C -Markierung im *Reporter*, wurde von JANA BOGENA synthetisiert. Schema 6 zeigt die Retrosynthese des neuartigen SOT^2 179-Reagenz **2**.



Schema 6 Retrosynthese des neuartigen Sulfoxid-basierten isobaren Markierungsreagenz SOT^2 179 **2** ausgehend von *L*-Homocystin **4**, 1,1-Dimethylethylendiamin **5**, Bromessigsäure **6** und ^{13}C -markiertem 3-(Dimethylamino)propionsäure Hydrochlorid **7**.

Das isotope markierte Reagenz **2** kann ausgehend von *L*-Homocystin **4**, 1,1-Dimethylethylendiamin **5**, Bromessigsäure **6** und ^{13}C -markiertem 3-(Dimethylamino)propionsäure Hydrochlorid **7** dargestellt werden (Schema 6). Die 8-stufige Synthese ist in Schema 7 abgebildet. Im ersten Schritt wird der Methylester **8** von kommerziell erhältlichem *L*-Homocystin **4** gebildet. Die isotope markierte *Balancer*-Region wird mit der ^{13}C -markierten Säure **7** eingeführt. Nach der Amidierung zu **9** folgt die Reduktion zum freien Thiol **10**. Zur Installation der *Reporter*-Region, wird das freie Thiol **10** mit Bromessigsäure **6** in einer nukleophilen Substitution zum Thioether **11** umgesetzt.

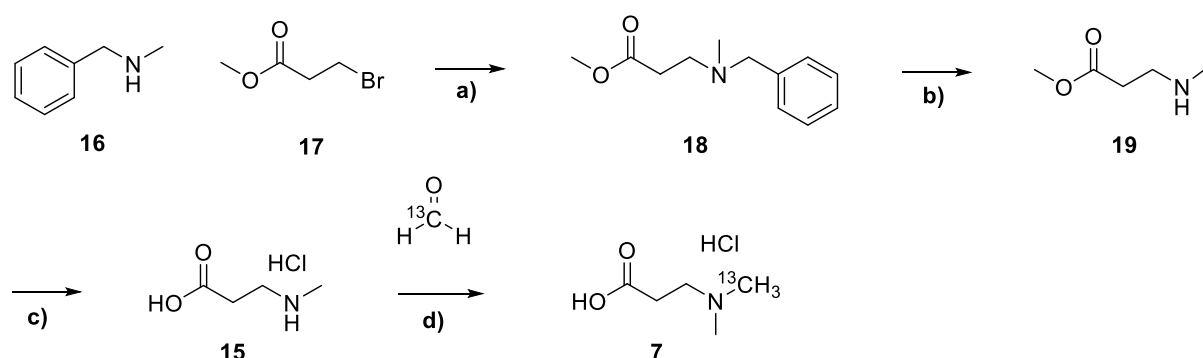
Die Amidierung mit 1,1-Dimethylethylendiamin liefert Amid **12**. Verseifung des Methylesters zur freien Säure **13**, Oxidation zum Sulfoxid **14** und finale Umwandlung in den aminreaktiven Aktivester führen zum neuen Markierungsreagenz SOT² 179 (**2**). Die Einführung der ¹³C-Markierung über isotopenmarkiertes 3-(Dimethylamino)propionsäure Hydrochlorid **7** erfolgt im zweiten Schritt der Syntheseroute. Die Darstellung der isotopologen Verbindung SOT² 180 **3** kann auf gleichem Weg mit kommerziell erhältlicher ¹³C-markierter Bromessigsäure durchgeführt werden.



Schema 7 Syntheschema für die Darstellung von **2**. Umwandlung von L-Homocystin **4** in den Methylester **8**, Amidierung des Methylesters mit der ¹³C-markierten Säure **7** zu **9**, gefolgt von der Reduktion zum Thiol **10**. Alkylierung mit Bromessigsäure **6** zu **11**, Amidierung mit 1,1-Dimethylethylendiamin **5** zu **12**, Verseifung des Methylesters zur freien Säure **13**, Oxidation zum Sulfoxid **14** und finale Darstellung des aminreaktiven Aktivesters **2**.

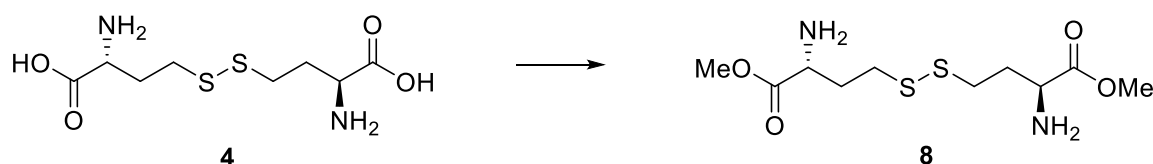
Für die Synthese von **2** ist die Darstellung der isotopenmarkierten Dimethylaminopropionsäure **7** notwendig. Schlüsselschritt der Synthese ist die selektive Einführung einer ¹³C-Markierung über eine *Eschweiler-Clarke-Reaktion*,^[94] der reduktiven Methylierung eines Amins mit Formaldehyd und einem Reduktionsmittel. Für die Synthese des benötigten sekundären Amins **15** wurde zunächst die Umsetzung von Chlorpropionsäure oder 3-Brompropionsäuremethylester mit Methylamin in Pyridin getestet. Die Reaktion lieferte das

Produkt jedoch nicht in zufriedenstellender Ausbeute und Reinheit. Das Hydrochlorid von 3-Methylaminopropionsäure **15** konnte jedoch erfolgreich über eine 3-stufige Synthese ausgehend von dem Benzyl-geschützten Amin **16** dargestellt werden (Schema 8).^[95] Hierfür wurde Methyl-3-brompropionat **17** mit *N*-Methyl-1-phenylmethanamin **16** in einer nukleophilen Substitution zum Benzyl-geschützten **18** umgesetzt. Die nachfolgende Benzylentschützung erfolgte mit 10 wt% Pd/C in MeOH und lieferte **19** mit einer Ausbeute von 98% nahezu quantitativ. Auf Grund der Flüchtigkeit von **19**, wurde nach Abdestillation von Methanol unmittelbar die Verseifung des Methylesters mit 5M HCl durchgeführt. Die *Eschweiler-Clarke*-Methylierung von **15** mit ^{13}C -Formaldehyd und Ameisensäure in der Mikrowelle lieferte, die ^{13}C -markierte Verbindung **7**.^[96]



Schema 8 Darstellung des ^{13}C -markierten Dimethylaminopropionsäure Hydrochlorids **7**. a) Na_2CO_3 (10.0 Äq) in MeCN, 70 °C, 16 h, 92%. b) H_2 , Pd-C, MeOH, RT, 16 h, c) 5M HCl, 8 h, Rückfluss, 71% über 2 Stufen d) 88% Ameisensäure in H_2O , 110 °C, 100 W, 1 h, 86%.

Nach erfolgreicher Darstellung des ^{13}C -markierten Bausteins **7**, konnte die Synthese des ^{13}C -markierten isobaren Markierungsreagenz **2** nach Syntheseroute aus Schema 7 durchgeführt werden. Der Einbau des ^{13}C -markierten Bausteins **7** erfolgt im zweiten Syntheseschritt. Vor der Amidierung mit dem ^{13}C -markierten Baustein **7** wurden die Säurefunktionalitäten von *L*-Homocystin **4** mit Thionylchlorid in Methanol als Methylester geschützt (Schema 11). Die für die nukleophile Substitution benötigte Thiolfunktionalität liegt als Disulfid maskiert vor.

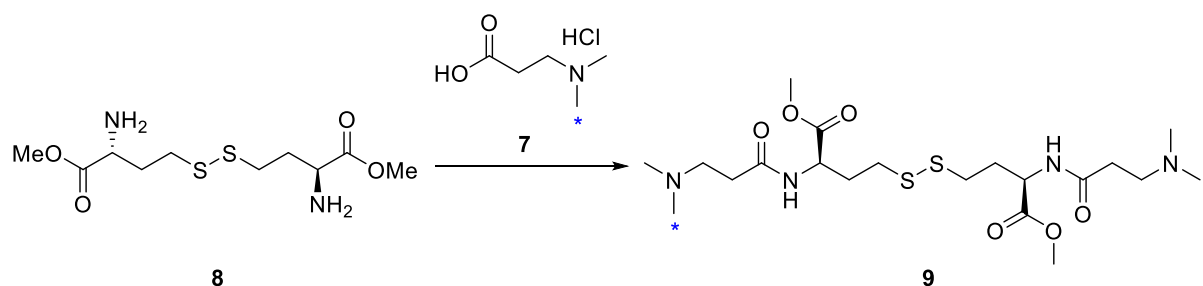


Schema 9 Veresterung von *L*-Homocystin **4** zu **8**. a) SOCl_2 (4.0 Äq), MeOH, 0 °C, 12 h, quantitativ.

Der Methylester **8** des HomoHomocystindimers wurde mit dem synthetisierten ^{13}C -markierten Baustein **7** in das Bisamid **9** umgewandelt. Neben der Entstehung des Bisamids **9** wurde die Entstehung des Monoamids beobachtet. Ursache der unvollständigen Umsetzung war ein hoher Anteil an HCl-Salz sowie geringe Ameisensäure-Reste im synthetisierten ^{13}C -markierte Baustein **7** (Berechnet aus NMR; Aceton als Internen Standard; 42%). Um die Rückstände an

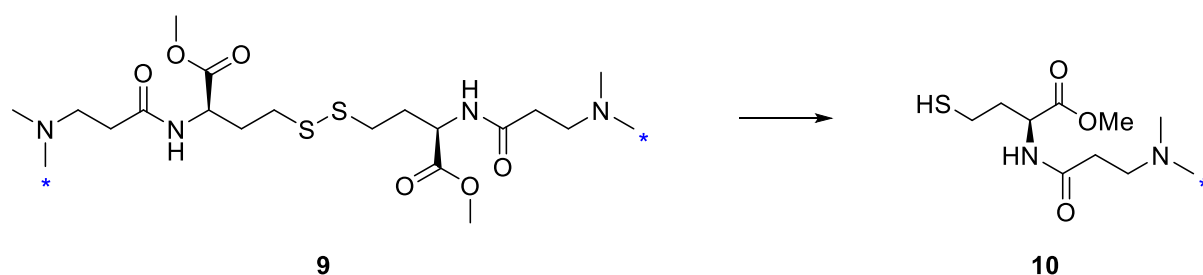
Ergebnisteil

Ameisensäure zu entfernen, wurde das Rohprodukt mehrfach mit Toluol koevaporiert. Es wurden verschiedene Lösungsmittelgemische zur Umkristallisierung getestet. Die höchste Reinheit und Ausbeute konnte durch Umkristallisation aus MeOH/Diethylether erzielt werden. Nach der Aufreinigung konnte **9** mit einer Ausbeute von 65% über 3 Schritte erzielt werden. Die Peptidkupplung des *L*-Homocystin Methylesters **8** mit dem aufgereinigten ^{13}C -markierten Baustein **7** mit EDC \cdot HCl, HOBT und NEt_3 in DMF lieferten Amid **9** schließlich in einer guten Ausbeute von 85%.



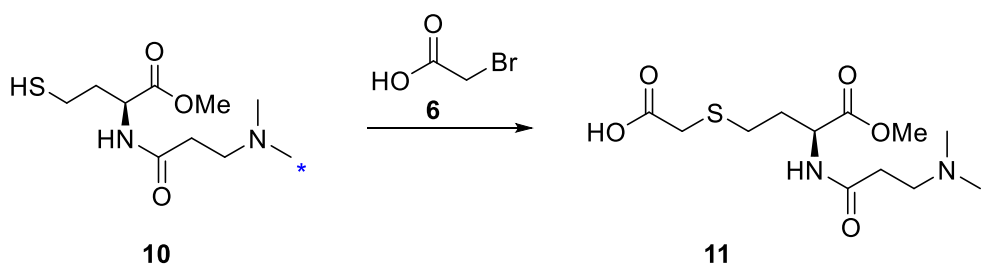
Schema 10 Amidierung des Methylesters **8** zu **9**. ^{13}C -markiertes **7**, EDC \cdot HCl (2.6 Äq), NEt_3 (3.5 Äq), HOBT (2.5 Äq), DMF, 60° C, 2h, 85%.

Die Disulfidbrücke des Amidierungsproduktes **9** wurde mit TCEP zum freien Thiol **10** reduziert (Schema 11). Das freie Thiol **10** ist jedoch äußerst reaktiv und neigt zu einer Vielzahl an Nebenreaktionen. Während der Lagerung bei -20°C wurde nach wenigen Tagen eine Braunfärbung des farblosen Öls erkennbar, was auf eine Zersetzung hindeutete. Zudem konnte nach der Säule eine große Menge an zurückoxidiertem Disulfid isoliert werden. Bei Raumtemperatur trat die Verfärbung bereits innerhalb weniger Stunden auf. Auch im NMR-Spektrum war die Entstehung von Verunreinigungen nach wenigen Stunden sichtbar. Auf Grund der hohen Reaktivität des freien Thiols **10** wurde dieses daher unmittelbar nach der Isolierung weiter umgesetzt.



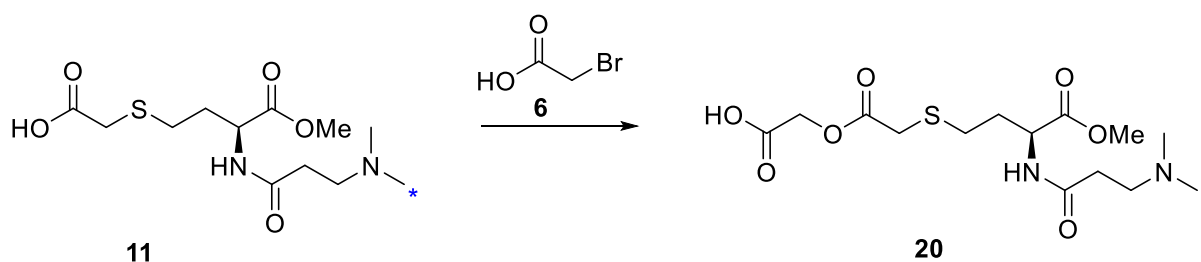
Schema 11 Darstellung des freien Thiols **10**. TCEP \cdot HCl (1.0 Äq), NaHCO_3 (4.2 Äq), DMF/H $_2\text{O}$ (5:1), 30 min, 45%.

Zur Einführung der *Reporter*-Gruppe wurde das freie Thiol **10** mit Bromessigsäure **6** in der Gegenwart von Triethylamin in DMF umgesetzt (Schema 12).



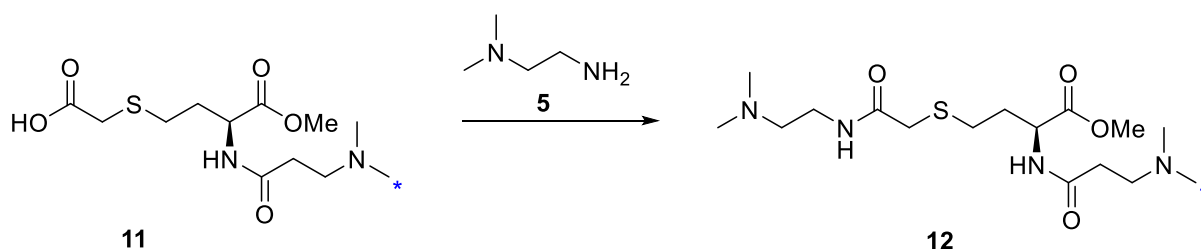
Schema 12 Synthese von **11** durch Umsetzung des Thiols **10** mit Bromessigsäure **6**. **6** (1.0 Äq), NEt₃ (1.5 Äq) in DMF, 50 °C 1 h, r.t 12 h, 12%.

Bei der Reaktionskontrolle über LC-MS wurde ein intensives Produktsignal bei $m/z = 366,06$ gefunden, welches auf die Entstehung von **20** als Nebenprodukt zurückgeführt werden kann (m/z berechnet für C₁₃¹³CH₂₅N₂O₇S⁺ [M+H]⁺: 366,14105). Das Nebenprodukt entsteht bei unerwünschter Weiterreaktion des Produktes **11** mit Bromessigsäure **6**. Die Ausbeute mit Bromessigsäure **6** betrug nur 12%. Mit Chloressigsäure und Heizen auf 50 °C, konnte eine etwas bessere Ausbeute von 18% erreicht werden.



Schema 13 Unerwünschte Nebenreaktion von **11**. Weiterreaktion mit Bromessigsäure **6** zu **20**.

Die anschließende Amidierung des Thioethers **11** zu **12** wurde mit 1,1-Dimethylethylendiamin (**5**) analog zur ersten Amidierung mit EDC·HCl als Aktivierungsreagenz, mit HOBt und Triethylamin in DMF durchgeführt (Schema 14).



Schema 14 Amidierung mit 1,1-Dimethylethylendiamin (**5**) zu **12**. (**5**) (1.2 Äq), HOBt (2.0 Äq), EDC·HCl (2.5 Äq), NEt₃ (1.5 Äq), DMF, RT, 12 h.

Bei der Aktivierung mit Carbodiimiden entstehen polare Harnstoffderivate, die sich in Regel in der wässrigen oder säulenchromatographischen Aufarbeitung leicht abtrennen lassen. **12** lies sich auf Grund der hohen Polarität säulenchromatographisch jedoch nur schwer aufreinigen. Das Produkt **12** eluierte auf Silica trotz polarem basischen Laufmittel (20:1 DCM/MeOH, 1% Ammoniak) erst sehr spät. Eine NMR-Analyse des Produktes zeigte, dass sich das in der Reaktion entstandene Harnstoffderivat nicht vom Amidierungsprodukt **12** abgetrennt hatte.

Abbildung 24 zeigt das isolierte Produkt im Vergleich zur reinen Verbindung, die zu einem späteren Zeitpunkt auf einem optimierten Syntheseweg dargestellt werden konnte (siehe 3.1.3).

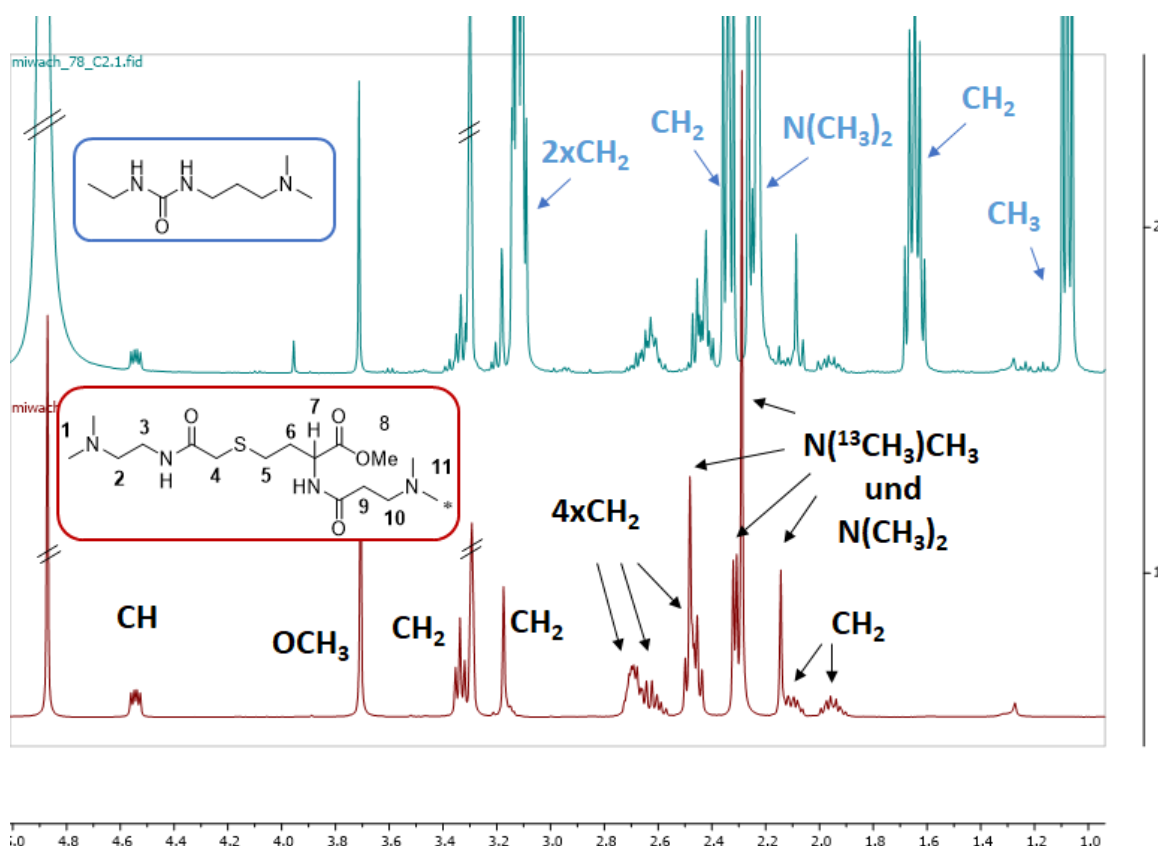
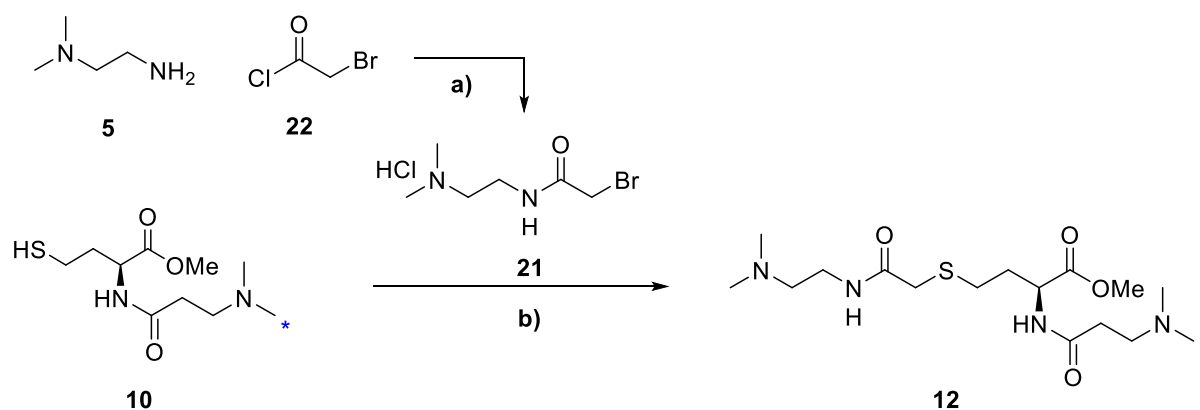


Abbildung 24 ^1H -NMR Spektrum des Amidierungsproduktes **12** aufgenommen in MeOD im Vergleich mit der reinen Verbindung, die zu einem späteren Zeitpunkt mit optimierter Syntheseroute isoliert werden konnte. Der obere Bereich, in blau dargestellt, zeigt das erhaltene Amidierungsprodukt **12** mit Harnstoff als Verunreinigung. Der untere Bereich, in rot dargestellt, zeigt die reine Verbindung.

Die Amidierung mit EDC·HCl schien nicht für die Darstellung von **12** geeignet zu sein. Daher wurde ein Alternativweg getestet, der sowohl den problematischen Amidierungsschritt umgehen sollte als auch die Nebenreaktion der freien Säuregruppe im Alkylierungsschritt vermeiden sollte. Es wurde *in situ* eine Alkylierungsreagenz **21** aus Bromacetylchlorid **22** und 1,1-Dimethylethylendiamin **5** hergestellt, welches *in situ* in einer nukleophilen Substitution mit dem freien Thiol **10** zum Thioether **12** umgesetzt wurde (Schema 15).

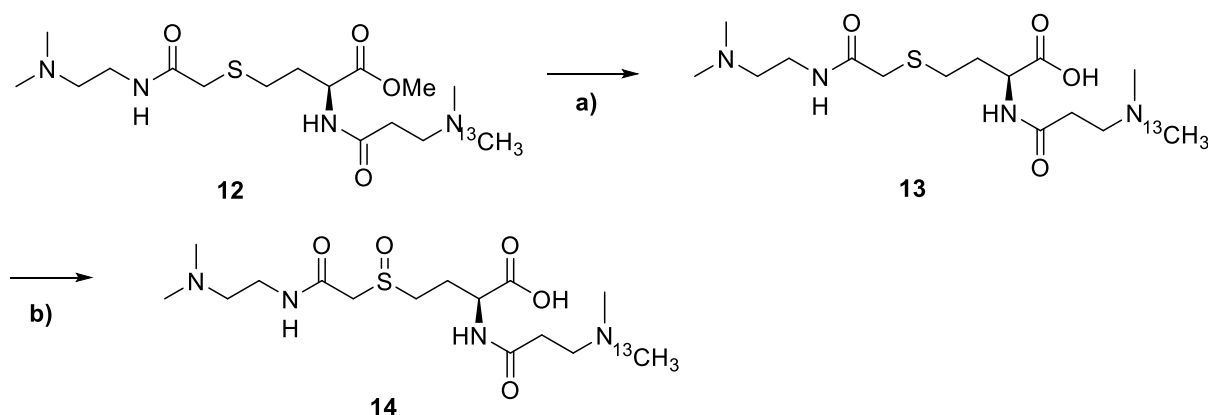
Ergebnisteil



Schema 15 Darstellung von **12** aus freiem Thiol **10** und Alkylierungsreagenz **21** über 2 Stufen. a) Bromoacetylchlorid **22** und 1,1-Dimethylethylendiamin **5**, Et₂O, -40° C, 10 min. b) NEt₃, DMF, 20 h, 6%.

Die Herstellung des Funktionalisierungs-Reagenz **21** erfolgte bei -40 °C in Diethylether innerhalb weniger Minuten. Die Reaktionskontrolle erfolgte über Dünnschichtchromatographie und LC-MS. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit einem Überschuss an DMF versetzt bis sich der entstandene farblose Niederschlag vollständig aufgelöst hatte. Nach Zugabe von NEt₃, wurde eine DMF-Lösung des freien Thiols **10** tropfenweise zur Reaktionslösung gegeben und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 20 Stunden Reaktionszeit war immer noch Alkylierungsreagenz **21** in der Reaktionskontrolle (DC und LC) nachweisbar. Daher wurden weitere 0.5 Äquivalente an freiem Thiol **10** zugegeben. Der Umsatz konnte jedoch nicht weiter erhöht werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung, konnte eine maximale Ausbeute von 6% an **12** erhalten werden. Das erhaltene Produkt wurde mit dem Rohprodukt des ursprünglichen Syntheseweges vereint und eine Aufreinigung über HPLC vor der finalen NHS-Ester Synthese angestrebt. Bereits geringe Mengen an ¹³C-markiertem Reagenz SOT² 179 (**2**) reichen für erste massenspektrometrische Experimente.

Für die finale Installation des aminreaktiven Aktivesters, muss der Methylester gespalten werden (Schema 16). Der Methylester **12** des Rohproduktes wurde mit LiOH in THF zu **13** gespalten. **13** trägt nun die *Balancer*- und *Reporter*-Funktionalitäten. Für eine effiziente Spaltung im Massenspektrometer muss noch die Sulfoxid-Funktion installiert werden. Die Oxidation von **13** mit *m*CPBA lieferte das Sulfoxid **14** als Hauptprodukt. Trotz Umsetzung bei 0°C und der langsamen Zugabe von *m*CPBA, wurde bei der Reaktionskontrolle *via* LC-MS die Entstehung des Sulfons (*m/z* berechnet für C₁₄¹³CH₃₁N₄O₆S⁺ [M+H]⁺: 396,19924; gefunden: 396,16) beobachtet.



Schema 16 Verseifung und Oxidation des **12** Rohproduktes. a) LiOH (3.0 Äq), THF/H₂O (1:1), r.t, 10 min; b) *m*CPBA (0.9 Äq), H₂O/DMF (4:1), 0 °C → RT, 1 h.

Da der finale NHS-Ester hydrolyseempfindlich ist, wurde eine finale HPLC-Aufreinigung auf der Stufe der freien Säure **14** angestrebt. Das Rohprodukt enthält während der Oxidation entstandenes Sulfon sowie bei der Amidierung entstandenen Harnstoff als Verunreinigung. Das Produkt konnte jedoch nicht mittels HPLC aus dem Rohprodukt isoliert werden. Um zu überprüfen ob die Reinheit des synthetisierten ¹³C-markierten Bausteins **7** Ursache für die geringe Ausbeute und Reinheit ist, wurde die Aufreinigung parallel mit dem unmarkierten Reagenz **1** sowie dem SOT² 180 (**3**) Reagenz getestet. Hierfür wurden verschiedene analytische HPLC-Läufe der Rohprodukte durchgeführt (*Reverse Phase* Silica-C¹⁸). Die beste Auftrennung wurde mit einem Gradienten von 0% auf 5% MeCN in 10mM Ammoniumformiat Puffer bei pH = 8 in 45 min erzielt. Die präparative HPLC wurde mit einer Puffer-Konzentration von 30 mM durchgeführt. Das Produkt eluierte mit einer Retentionszeit von 23 min recht spät. Im verwendeten HPLC *photodiode array* Detektor (PDA) wird ein Wellenlängenbereich von 210 nm bis 700 nm abgedeckt. In diesem Bereich zeigte die Fraktion mit dem enthaltenen Produkt kein signifikantes Signal, was vor allem an der geringen Produktmenge im Rohprodukt und weniger an der schlechten UV-Sichtbarkeit des nichtaromatischen Sulfoxids lag. Neben der Sulfon und Harnstoff-Verunreinigung waren vermutlich auch einige Salze im Rohprodukt enthalten. **1**, **2** und **3** konnten somit nicht in ausreichenden Mengen *via* HPLC isoliert werden, daher wurde die Syntheseroute optimiert.

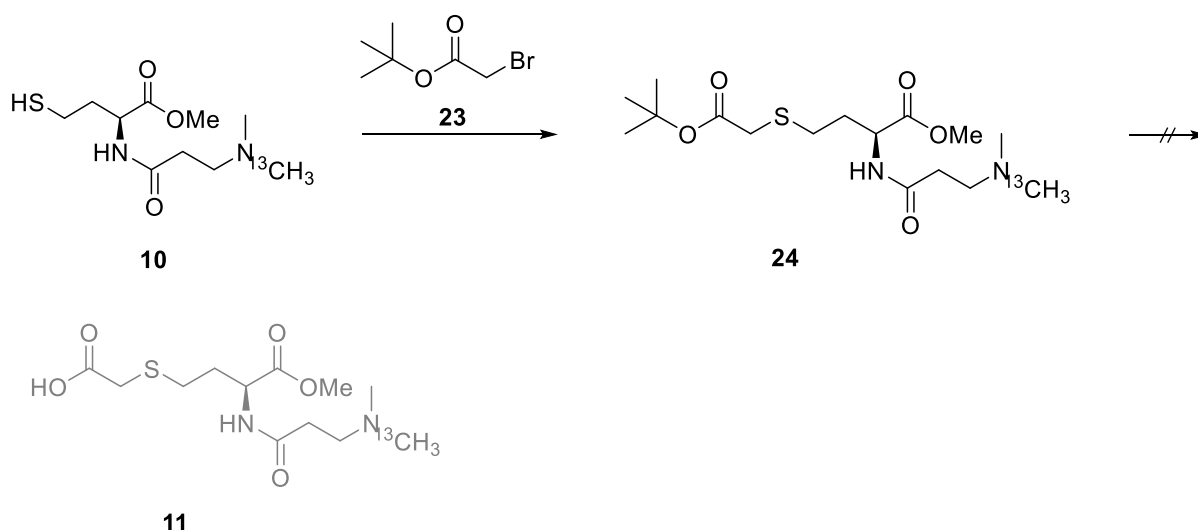
3.1.3 Optimierung der Syntheseroute des neuen isobaren Markierungsreagenz

Für die weitere Anwendung bedarf die Synthese des neuen isobaren Markierungsreagenz, erheblicher Verbesserungen. Im Wesentlichen müssen vier Punkte der etablierten Route optimiert werden. Zum einen sollte eine geeignete Schutzgruppe für die Bromessigsäure (**6**) gefunden werden. Die Säurefunktion muss während der Alkylierung geschützt sein. Zum anderen sollten bessere Reaktionsbedingungen für die zweite Amidierung gefunden werden, um die Entstehung nicht abtrennbarer Nebenprodukte zu vermeiden. Auch die Oxidationsbedingungen müssten verbessert werden, um eine Überoxidation zum Sulfon zu

vermeiden. Letztendlich sollte noch ein zusätzlicher Entsalzungsschritt zum letztmöglichen Zeitpunkt der Synthese eingebaut werden. Im Einzelnen wurde angestrebt:

- Schutzgruppenstrategie für den Alkylierungsschritt sowie *in situ* Reduktion zum Thiol
- Optimierung der zweiten Amidierung zur Vermeidung nicht-abtrennbarer Nebenprodukte
- Oxidationsschritt ohne Überoxidation zum Sulfon
- Zusätzlicher Entsalzungsschritt

Bei der Umsetzung des Thiols **10** mit freier Chlor- oder Bromessigsäure **6** entsteht **20** als Nebenprodukt. Es entsteht durch Weiterreaktion des Alkylierungsproduktes **11** mit einem weiteren Halogenessigsäure-Molekül. Um diese Weiterreaktion zu vermeiden, stehen verschiedene Schutzgruppen zur Verfügung um die Säurefunktion zu schützen. Zunächst wurde ein *tert*-Butylester als Schutzgruppe getestet (Schema 17).



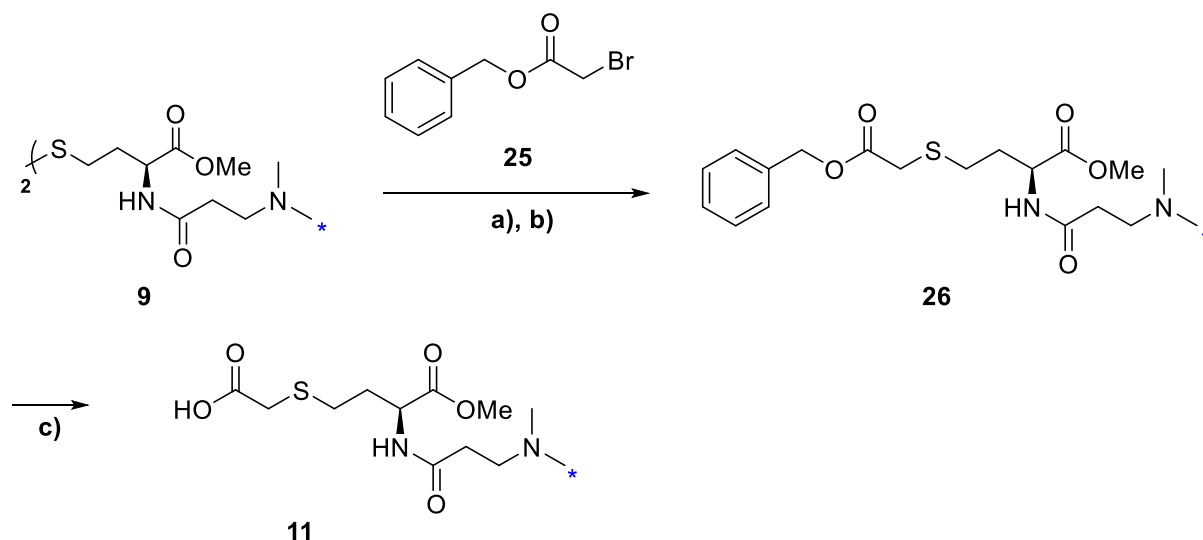
Schema 17 *tert*-Butylester als Schutzgruppe für die Maskierung der Säurefunktion.

Hierfür wurde das Thiol **10** mit Bromessigsäure-*tert*-butylester **23** und Triethylamin in DMF erfolgreich zu **24** umgesetzt. Eine Entschützung des Esters **24** war jedoch unter verschiedenen getesteten Bedingungen nicht möglich. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die getesteten Entschützungsbedingungen:

Tabelle 1 Getestete Bedingungen zur Entschützung des *tert*-Butylesters **24**.

Entschützung	Bedingungen	Ausbeute
TFA/DCM	RT, 12 h; 40°C, 1 h	keine Entschützung möglich
Et ₃ SiH, TFA/DCM	RT, 12 h; 60° C, 2 h	keine Entschützung möglich
HCl, AcOH, DCM	RT, 12 h, 40 °C, 2 h	keine Entschützung möglich

Neben dem *tert*-Butylester bietet sich ein Benzylester als Säure-Schutzgruppe an. Auf Grund der hohen Reaktivität des freien Thiols **10**, wurde eine *in situ* Reduktion zum freien Thiol unmittelbar vor der Alkylierung getestet. Die Umsetzung des *in situ* gebildeten Thiols **10** mit Benzyl-geschützte Bromessigsäure **25** und NEt₃ in DMF lieferte Alkylierungsprodukt **26** in einer sehr guten Ausbeute von 95% (Schema 18).

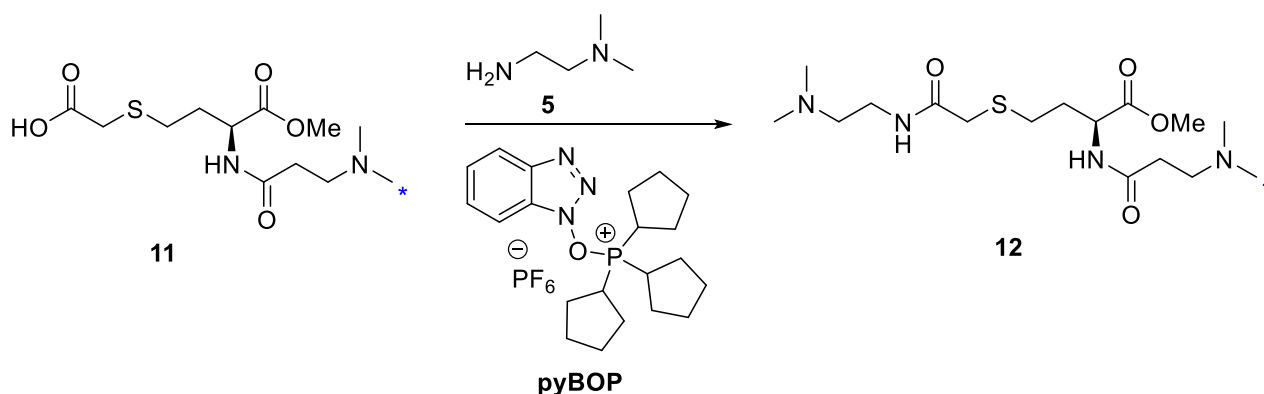


Schema 18 Synthese von **11** über mit Benzylester-Schutzgruppenstrategie. a) TCEP·HCl (1,0 Äq), NaHCO₃ (4,2 Äq), DMF/H₂O (3:1), 10 min; b) Benzylbromoacetat **25** (2,3 Äq), RT, 2 h, 95% über 2 Stufen; c) 10% Ameisensäure in MeOH, 100 wt% Pd *black*, 40 °C, 2 h, 81%.

In Zusammenarbeit mit *Jana Bogena* und *Michael Stadlmeier* wurden verschiedene Methoden zur Entschützung des Benzylesters getestet. Mit H₂/Pd-C in MeOH konnte keine Entschützung beobachtet werden. Erst mit 100 wt% Palladium *black* bei 40 °C konnte **11** mit einer Ausbeute von 81% dargestellt werden.

Da bei der Amidierung des Thioethers **11** mit 1,1-Dimethylethylendiamin **5** bei Verwendung von EDC·HCl als Aktivierungsreagenz ein nicht-abtrennbares Harnstoffderivat entsteht, muss eine andere Amidierungsmethode gewählt werden. Um die Entstehung von schlecht abtrennbaren Nebenprodukten, wie dem Harnstoff mit gleicher Retentionszeit, zu vermeiden wurde die Aktivierung als Säurechlorid getestet. Thionylchlorid wurde zu einer 0 °C kalten Lösung von **11** in DMF gegeben. Bei der langsamen Zugabe einer DMF-Lösung des Amins **5**, verfärbte sich die Reaktionslösung braun. Eine Reaktionskontrolle mittels DC, lies auf Zersetzung des Eduktes oder das Auftreten vieler Nebenreaktionen schließen. Auch durch Umsetzung mit Oxalylchlorid in DMF bei 0 °C konnte das Produkt **12** nicht hergestellt werden. Als nächstes wurde die Aktivierung mit dem Phosphonium Salz pyBOB getestet. Bei der Reaktion entsteht ebenfalls ein Harnstoffderivat, welches jedoch unpolarer ist und bei der säulenchromatographischen Aufreinigung daher früher auf Silica eluieren sollte. Mit pyBOP als Aktivierungsreagenz konnte **12** schließlich mit einer guten Ausbeute von 73% und in sehr

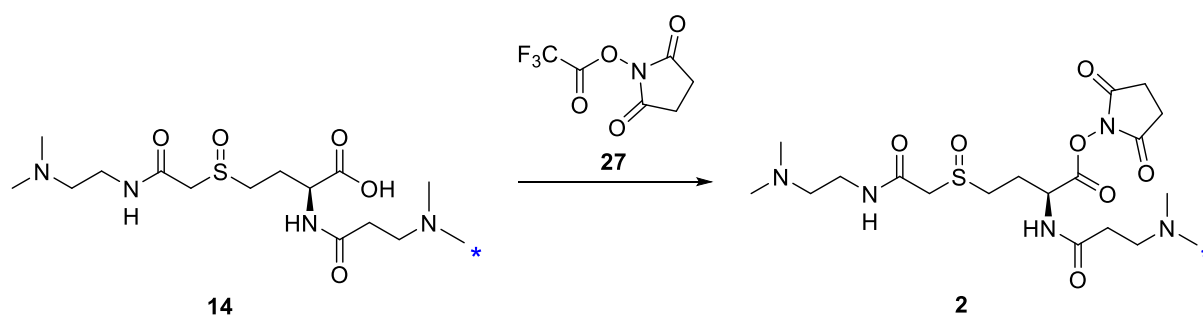
hoher Reinheit erhalten werden (Schema 19). Das entstandene Phosphorsäuretriamid konnte dann in der Tat leicht vom Amidierungsprodukt **12** abgetrennt werden.



Schema 19 Darstellung von **12** mit pyBOP als Aktivierungsreagenz. *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin (**5**) (1.2 Äq), DIPEA (1.5 Äq), pyBOP (1.2 Äq), DMF, 40 °C, 1 h, 73%.

Da es unter den getesteten Reaktionsbedingungen zu einer Weiteroxidation zum Sulfon kam, mussten andere Reaktionsbedingungen gefunden werden. Durch Ansäuern des Lösungsmittels mit HCl auf den pH = 2, lief die Reaktion kontrollierter ab, da sich das *m*CPBA bei diesem pH-Wert nicht vollständig in Lösung befand, und die Reaktion vermutlich somit nur an der Oberfläche stattfand. Durch ständige Reaktionskontrolle und das sofortige Entfernen von überschüssiger *m*CPBA durch Zugabe von Wasser und Extraktion mit DCM, konnte das reine Sulfoxid in einer Ausbeute von 75% erhalten werden.

Nach erfolgreicher Darstellung des Amids **12**, folgte die quantitative Verseifung mit LiOH zur freien Säure **13**. Da bei der finalen HPLC-Aufreinigung des Produktes neben anderen Verunreinigungen auch ein hoher Salzanteil im Rohprodukt gefunden wurde, wurde an dieser Stelle der Synthese ein zusätzlicher Entsalzungsschritt eingebaut. Eine Entsalzung der freien Säure **13** über Ionentauscherharze war nicht möglich, da das Produkt nicht mehr vom Harz eluiert werden konnte. Die Entsalzung über HyperSep™ C₁₈ Kartuschen nach einem Standardprotokoll konnte den Salzanteil auf ein Minimum reduzieren, was auch durch Umwandlung des Feststoffes in einen farblosen Schaum sichtbar war. Nach erfolgreicher Darstellung der freien Säure **13**, konnte schließlich die finale Darstellung des aminreaktiven NHS-Aktivesters **2** erfolgen. Hierfür wurde *N*-Trifluoressigsäuresuccinimid (NHS-TFA, **27**) aus *N*-Hydroxysuccinimid und Trifluoressigsäureanhydrid hergestellt. Der Aktivester **2** wurde schließlich durch Umsetzung mit frisch synthetisiertem NHS-TFA **27** in der Gegenwart von Pyridin in DMF dargestellt. Eine Aufreinigung über Säulenchromatographie ist auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit von **2** nicht möglich. Daher wurde der Rückstand mehrfach in Acetonitril gelöst und mit eiskaltem Aceton gefällt.

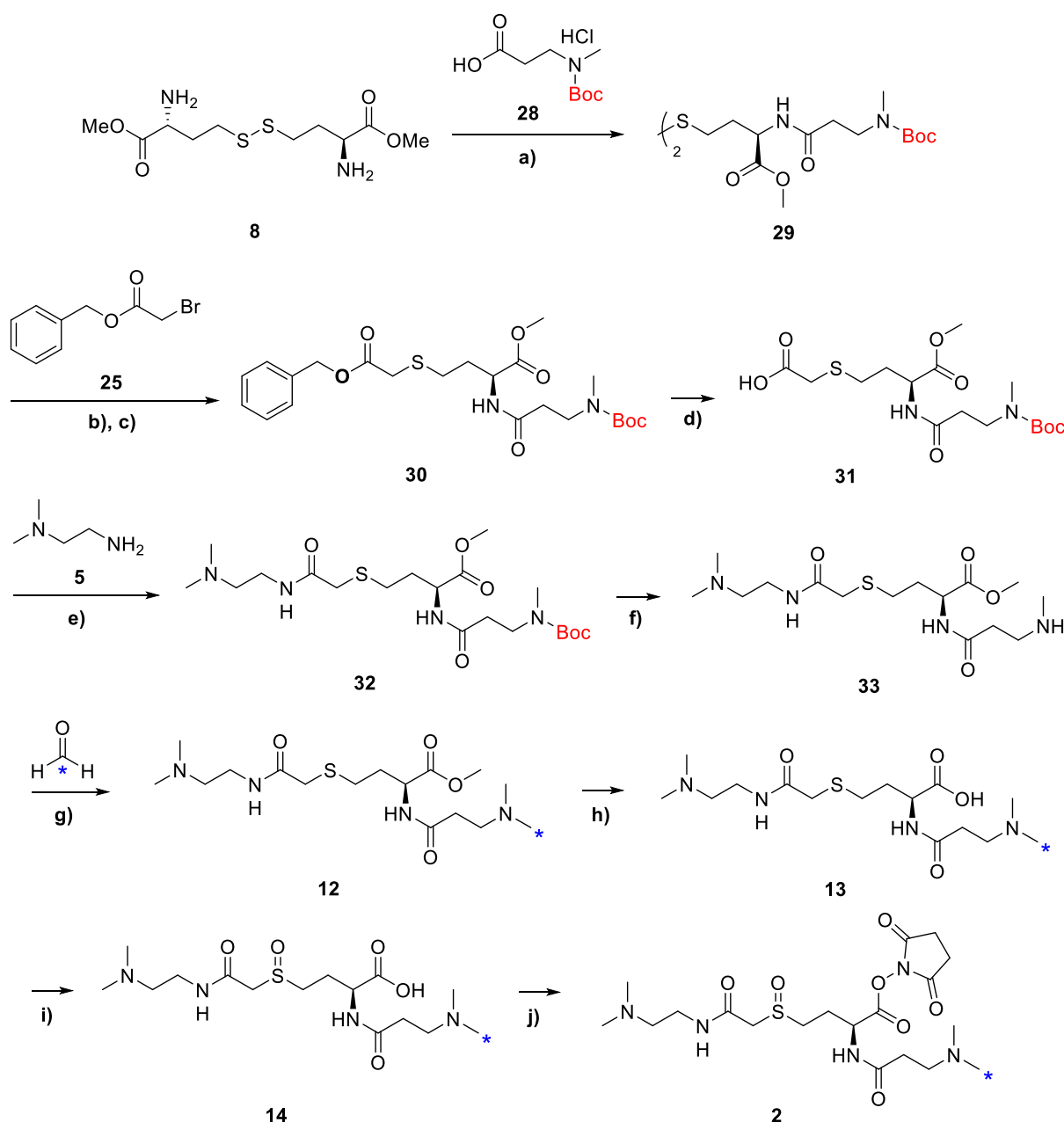


Schema 20 Darstellung des Aktivesters **2**. NHS-TFA **27** (2.0 Äq), Pyridin (2.0 Äq), DMF, 4 h, RT, 35%.

Nach Optimierung der Syntheseroute, konnte das ^{13}C -markierte Reagenz SOT² 179 (**2**) über 9 Schritte ausgehend von ^{13}C -markiertem Baustein **7** und *L*-Homocystin (**4**) in einer Gesamtausbeute von 12% dargestellt werden. Auf die Evaluierung des neuen isobaren Markierungsreagenz wird unter Punkt 3.1.6 eingegangen.

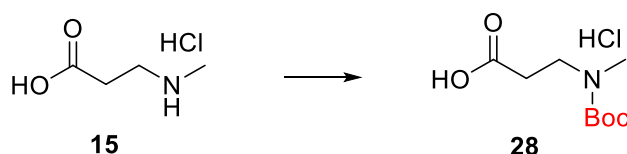
3.1.4 Kostengünstigere Syntheseroute für die gezielte Synthese der ^{13}C -markierten Variante SOT² 179 (**2**)

Die unter Punkt 3.1.3 beschriebene optimierte Syntheseroute ist ideal für die Darstellung von unmarkiertem isobaren Markierungsreagenz **1** sowie des SOT² Isotopomeren 180 (**3**) mit ^{13}C -Markierung im *Reporter*. Die Route eignet sich jedoch nicht für die effektive Darstellung der isotopomeren Struktur SOT² 179 (**2**), mit ^{13}C -Markierung in der *Balancer*-Region. Limitierender Faktor der Synthese von **2** ist der hohe Preis von ^{13}C -markiertem Formaldehyd. Der Einbau der Isotopenmarkierung erfolgt im zweiten Schritt der 9-stufigen Syntheseroute. Um größere Mengen an ^{13}C -markiertem Reagenz **2** für massenspektrometrische Messungen bereitzustellen wurde eine Route entwickelt um die Isotopenmarkierung zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese einzuführen. Schema 21 zeigt die entwickelte Synthese. Der Schlüsselschritt der *Eschweiler-Clarke*-Methylierung mit ^{13}C -Formaldehyd und Ameisensäure erfolgt hier erst am Ende im siebten Schritt der 11-stufigen Synthese (ausgehend von *L*-Homocystin **4**). Die Position der ^{13}C -Markierung wird bis zur *N*-Methylierung mit einer *N*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (*N*-Boc) geschützt, welche nach TFA-Entschützung als freies Amin vorliegt.



Schema 21 *N*-Boc-Schutzgruppenstrategie zur Darstellung von **2**. a) *N*-Boc geschützte Säure **28**, EDC·HCl (2.6 Äq), NEt₃ (3.5 Äq), HOBt (2.5 Äq), DMF, 60° C, 2h, 79%; b) TCEP·HCl (1,0 Äq), NaHCO₃ (4,2 Äq), DMF/H₂O (4:1), 10 min; c) Benzylbromoacetat (2,3 Äq), RT, 2 h, 82% über 2 Stufen; d) 10% Ameisensäure in MeOH, 100 wt% Pd *black*, 40 °C, 2 h, 83%; e) *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin, DIPEA (1.5 Äq), pyBOP (1.2 Äq), DMF, 40 °C, 1 h, 71%; f) *one-pot* Entschützung in g) ¹³C-Formaldehyd, 88% Ameisensäure in H₂O, 110 °C, 100 W, 1 h, 79% über 2 Stufen h) LiOH (3.0 Äq), MeOH/H₂O (2.5:1), RT, 1 h, 92% i) *m*CPBA (1.0 Äq), pH = 2, H₂O, 69%; j) NHS-TFA (2.0 Äq), Pyridin (2.0 Äq), DMF, 4 h, RT, 35%.

Die benötigte *N*-Boc-geschützte Säure **28** wurde einfach aus dem 3-(Methylamino)propionsäure hydrochlorid **15** Baustein mit Boc₂O und NEt₃ in DCM mit einer Ausbeute von 86% hergestellt.



Schema 22 Darstellung der *N*-Boc geschützten Säure **28** aus **15**. Boc_2O (1.1 Äq), NEt_3 (2.0 Äq) in DCM, 24 h, RT, 86%.

Um die Realisierbarkeit der Strategie zu überprüfen, wurde zunächst der Schlüsselschritt der *Eschweiler-Clark-Reaktion* an der *N*-Boc-geschützte Säure **28** getestet (hier nicht dargestellt). Nachdem die Reaktion selektiv das gewünschte Produkt lieferte, wurde die geplante Syntheseroute (Schema 21) durchgeführt. Die Amidierung mit **28** zu Amid **29**, Reduktion, Alkylierung sowie Benzylester-Entschützung und zweite Amidierung mit **5** zu **32** konnten mit vergleichbaren Ausbeuten zur optimierten Syntheseroute aus 3.1.3 durchgeführt werden (siehe Schema 21). Die *N*-Boc-Entschützung von **32** wurde zunächst in einer Lösung aus TFA in DCM (1:6) durchgeführt. Trotz Fällung aus MeOH/EtOH waren Reinheit und Ausbeute von **31** ungenügend. Daher wurde eine *one-pot* Entschützung von **32** zusammen mit der *Eschweiler-Clarke* Methylierung getestet. Die Eintopf-Reaktion wurde zunächst mit unmarkiertem Formaldehyd in der Mikrowelle getestet. Nachdem die parallele Entschützung und *N*-Methylierung im Mikrowellengefäß erfolgreich waren, wurde isotopenmarkiertes **12** in gleicher Weise mit ^{13}C -markiertem Formaldehyd ausgehend von **32** in einer Ausbeute von 79% hergestellt. Verseifung zu **13**, Oxidation zu **14** und Aktivester-Synthese zu **2** wurden ebenfalls nach der optimierten Route aus 3.1.3 durchgeführt. So konnte das Reagenz SOT² 179 (**2**) ausgehend von Methyl ester **8** und *N*-Boc geschütztem *N*-Methyl- β -Alanin **28** über 11 Schritte, davon zwei *one-pot*-Reaktionen, in hoher Reinheit mit einer Gesamtausbeute von 7% hergestellt werden.

Mit dem späten Einbau der Isotopenmarkierung lässt sich der Verbrauch an ^{13}C -Formaldehyd deutlich reduzieren (Abbildung 25). So können auf der neuen Route aus einer Ampulle ^{13}C -Formaldehyd (20 wt% in H_2O , 1 g, 6.45 mmol) 232 mg (486 μmol) an isobarem Markierungsreagenz **2** hergestellt werden. Im Gegensatz dazu erhält man auf der Route 3.1.3 nur 60 mg (126 μmol) an Reagenz **2**. Auf der neuen Route kann man also fast die 4-fache Menge an Reagenz **2** herstellen. Dieser direkte Vergleich ist in Abbildung 25 dargestellt.

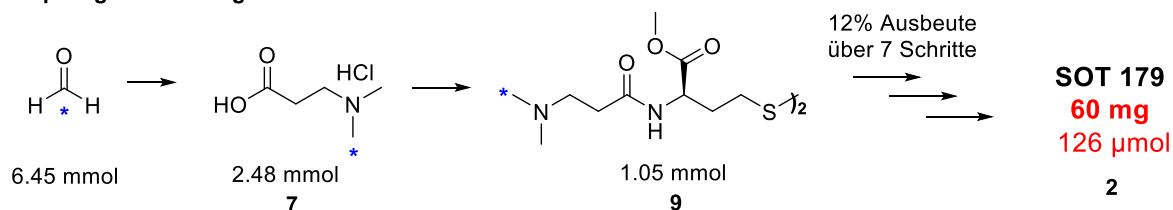
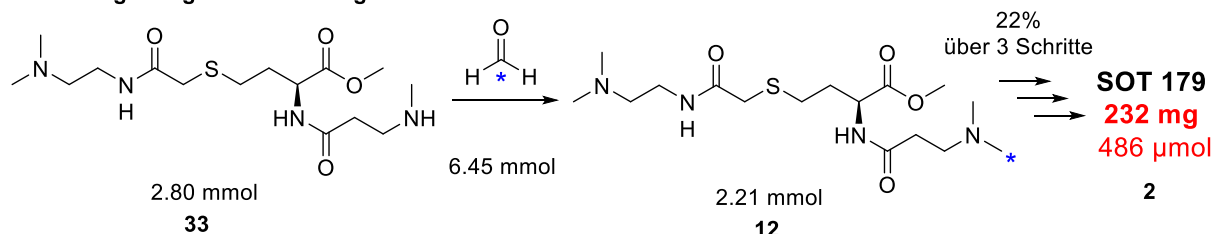
Ursprüngliche Strategie**Kostengünstigere Boc-Strategie**

Abbildung 25 Gegenüberstellung des Verbrauchs an ^{13}C -Formaldehyd der alten und der neuen Syntheseroute. 3,9-fache Menge an **2** aus einer Ampulle ^{13}C -Formaldehyd auf der neuen Route gegenüber dem alten Syntheseweg.

3.1.5 Synthese in Richtung des zweifach ^{13}C -markierten SOT-Reagenz zur gleichzeitigen Untersuchung von drei Proben

Für die gleichzeitige quantitative Untersuchung dreier Proben ist die Darstellung eines Triplex notwendig. Ein Triplex besteht aus drei Verbindungen mit identischem Molekulargewicht, die bei der Spaltung im Massenspektrometer *Reporter*-Ionen mit unterschiedlichen Massen generieren. Abbildung 26 zeigt die drei isobaren Strukturen für die mögliche Realisierung eines solchen Triplex.

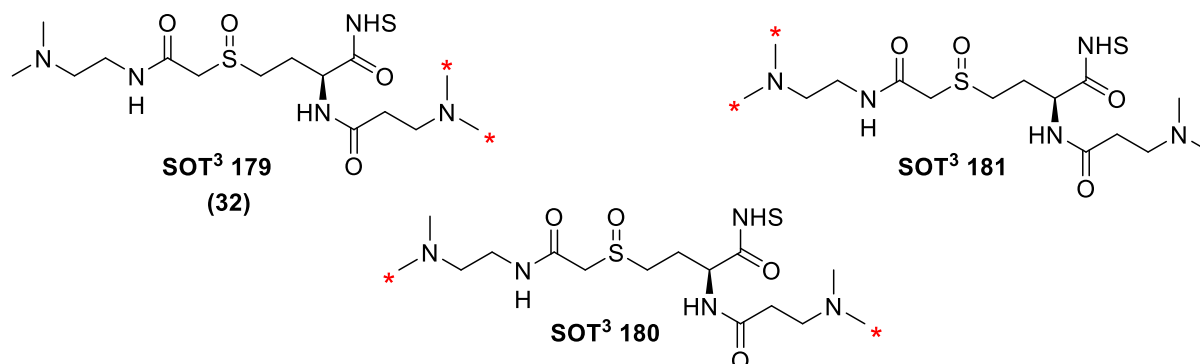
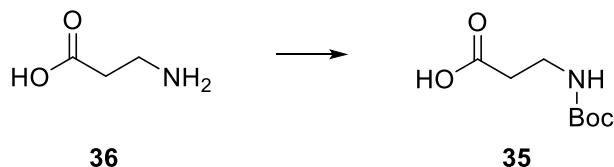


Abbildung 26 Zur gleichzeitigen Messung dreier Proben benötigter Triplex, bestehend aus drei isobaren Strukturen.

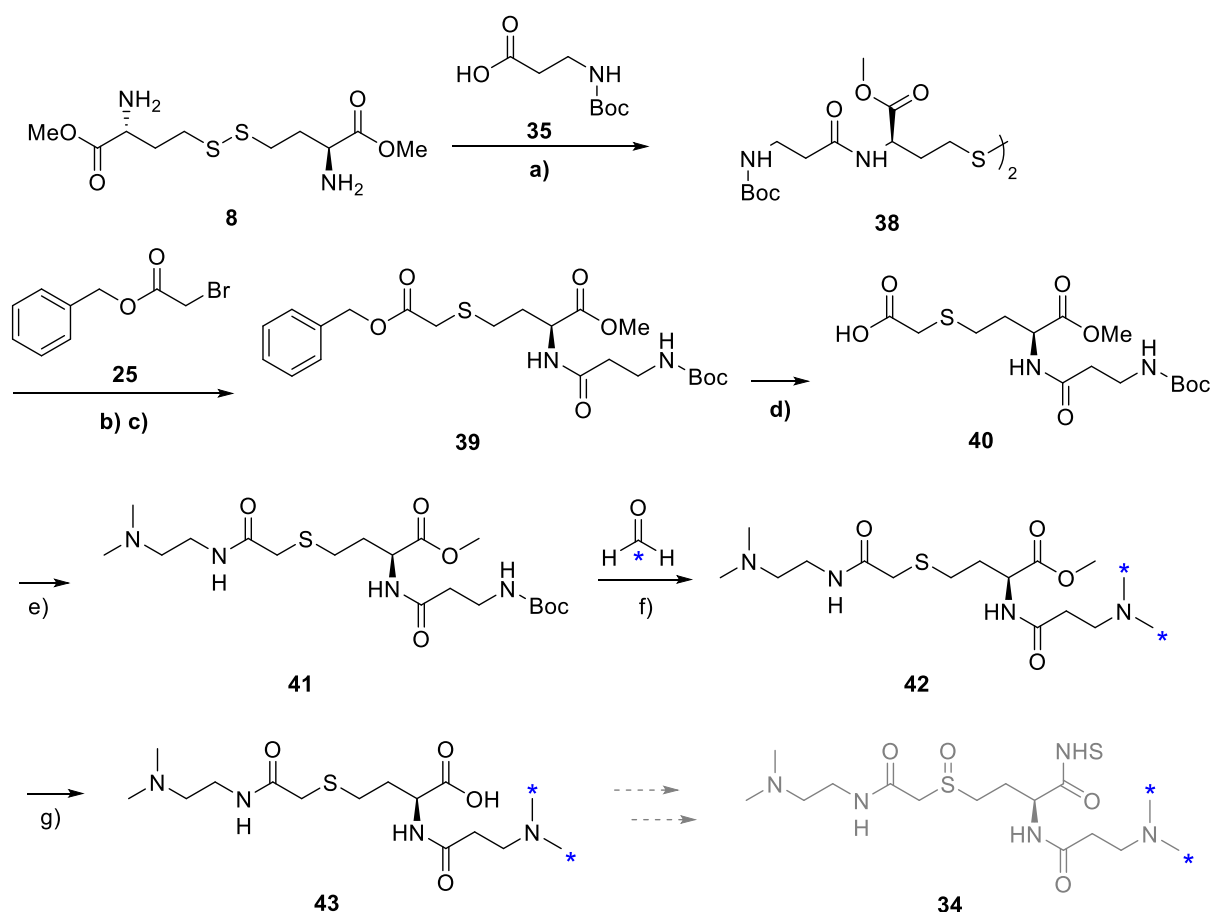
Für die Synthese von SOT³ 179 **34** ist die Einführung zweier ^{13}C -Markierungen erforderlich. Nach Vorbild der optimierten Syntheseroute aus 3.1.3, sowie der unter 3.1.4 beschriebenen *N*-Boc-Strategie zur Reduzierung des Verbrauchs an ^{13}C -Formaldehyd wurde die unter Schema 24 abgebildete Route zur Darstellung von **34** geplant. Die Einführung der ^{13}C -Markierungen sollte zum letztmöglichen Zeitpunkt erfolgen. Es wurde *N*-Boc-geschütztes β -Alanin **35** als Grundbaustein gewählt, welches nach *N*-Boc-Entschützung als freies Amin vorliegt und somit die Einführung von zwei ^{13}C -markierten Methylgruppen während der *Eschweiler-Clark-Reaktion* mit isotopenmarkiertem Formaldehyd ermöglicht. Um die

Realisierbarkeit der Strategie zu überprüfen, wurde zunächst der Schlüsselschritt der *Eschweiler-Clark-Reaktion* an β -Alanin **36** erfolgreich getestet. Der für die Syntheseroute benötigte *N*-Boc-geschützte β -Alanin Baustein **35** konnte einfach aus β -Alanin **36** und Boc_2O in einer Ausbeute von 93% dargestellt werden (Schema 23).



Schema 23 *N*-Boc-Schützung von β -Alanin **36** zu **35**. Boc_2O (1.1 Äq), NaOH (1.1 Äq) in *t*BuOH/H₂O, 12 h, RT, 93%.

Auf der entworfenen Route konnte erfolgreich die zweifach ¹³C-markierte Zwischenstufe **43** dargestellt werden. Oxidation und NHS-Ester Synthese wurden nicht mehr zu Ende geführt, da die Evaluierung des SOT-Reagenz *via* LC-MS/MS zeigte, dass eine Überarbeitung des Reagenzdesigns nötig ist (3.1.6). Die Methode der gleichzeitigen Einführung von zwei ¹³C-markierten Methylgruppen über die getestete Mikrowellenreaktion, lässt sich jedoch auch auf die Synthese eines überarbeiteten Designs anwenden, sofern die gleiche *Reportergruppe* beibehalten wird.



Schema 24 Synthese zum zweifach ¹³C-markierten **37**. a) N-Boc geschützte Säure **35**, EDC·HCl (2.6 Äq), NEt₃ (3.5 Äq), HOBT (2.5 Äq), DMF, RT, 12 h, 52%; b) TCEP·HCl (1,0 Äq), NaHCO₃ (4,2 Äq), DMF/H₂O (4:1), 10 min; c) Benzylbromoacetat (2,3 Äq), RT, 2 h, 75% über 2 Stufen; d) 10% Ameisensäure in MeOH, 100 wt% Pd black, 40 °C, 2 h, 79%; e) N,N-Dimethylethan-1,2-diamin, DIPEA (1.5 Äq), pyBOP (1.2 Äq), DMF, 40 °C, 1 h, 53%; f) one-pot Entschützung in 88% Ameisensäure in H₂O, 110 °C, 100 W, 1 h, 39% über 2 Stufen; g) LiOH (3.0 Äq), THF/H₂O 1:1, 1 h.

3.1.6 Evaluierung des neuen isobaren Markierungsreagenz

3.1.6.1 Fragmentierungseigenschaften des neuen SOT-Reagenz

Die massenspektrometrische Evaluierung des Reagenzes wurde von *Michael Stadlmeier* durchgeführt. Um das neue Reagenz mit dem kommerziell erhältlichen TMT-Reagenz zu vergleichen, wurde ein typisches Duplex-Experiment nach *Bottom-Up* Methode durchgeführt. Hierfür wird ein Protein-Verdau anstelle eines intakten Proteins markiert, wie es bei der *Top-Down* Methode üblich wäre (1.2). Für die Analyse der Fragmentierungseigenschaften des neuen isobaren SOT-Markierungsreagenz, wurde ein Duplex-Experiment, also die gleichzeitige Untersuchung zweier Proben in einer Messung, mit menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK Zellen, *Human Embryonic Kidney*-Zellen) durchgeführt. Im Folgenden wird der Ablauf des Experimentes am Beispiel des neuen SOT-Reagenz-Duplex (SOT² 179 **2** und SOT² 180 **3**) erklärt. Das gleiche Experiment wurde analog mit dem kommerziell erhältlichen TMT-Duplex bestehend aus TMT² 126 **44** und TMT² 127 **45** durchgeführt. Die hier diskutierten Daten wurden bereits veröffentlicht.^[97] Für das Experiment wurde ein HEK-Lysat verdaut und

die erhaltene Peptidmischung in zwei Teile geteilt. Ein Teil der Mischung wurde mit dem Reagenz SOT² 179 **2** behandelt, bei dem die Isotopenmarkierung in der *Balancer*-Region liegt. Der andere Teil wurde mit dem Reagenz SOT² 180 **3** umgesetzt, bei dem sich die Markierung in der *Reporter*-Region befindet (pH = 8.5, 150 mM Triethylammoniumbicarbonat Puffer, 1.5 mg Reagenz, 60 min; die TMT-Markierung wurde nach Herstelleranweisungen durchgeführt). Nach der Markierung wurden die Proben in einem 1:1-Verhältnis gemischt, entsalzt^[98] und konzentriert. Die erhaltenen Peptidmischungen, wurden anschließend in einem nanoHPLC-MS²-Experiment gemessen. Wie im Abschnitt 1.3.3.2 beschrieben, sind sequenzgleiche markierte Peptide im MS¹-Scan ununterscheidbar. Bei der MS-induzierten Spaltung werden leichte (weißes Dreieck) und schwere (schwarzes Dreieck) *Reporter*-Ionen sowie unterscheidbare Komplementärionen gebildet (Abbildung 27). Die erhaltenen Daten wurden durch die Max-Quant Software^[99] und eine von *Michael Stadlmeier* entwickelte Software analysiert.

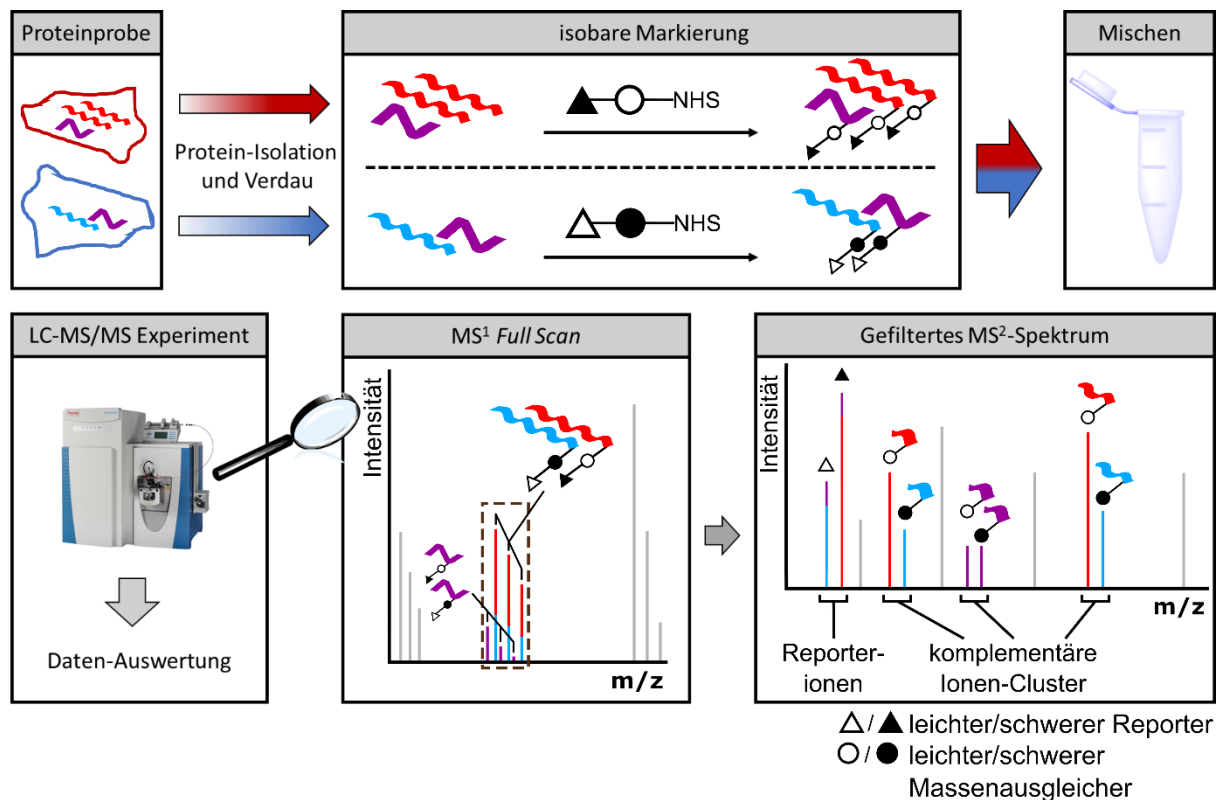


Abbildung 27 Schematische Darstellung des Duplex-Experimentes mit HEK-Lysat nach der *Bottom-Up* Methode. Der Verdau des Zelllysates wird in zwei Teile geteilt. Diese Teile werden jeweils mit einer isotopologen Version des Duplex-Reagenz markiert. Die markierten Peptide werden im 1:1-Verhältnis gemischt, in einem LC-MS/MS-Experiment gemessen und schließlich *Software*-gestützt ausgewertet. Das Verhältnis der *Reporter*-Ionen ist durch ko-isolierende Peptide (lila) verzerrt. Die komplementären Ionen-Cluster können ohne Verzerrung analysiert werden. Die Abbildung wurde nach einer Abbildung der veröffentlichten Publikation modifiziert.^[97]

Abbildung 28 zeigt die im Massenspektrometer entstehenden Fragmente der SOT- und TMT-markierten Peptide im Vergleich. Nach der Ionisierung in der Quelle erhält man geladene Mutterionen, die geladenen Reagenz-Peptid-Konjugate. Bei der nachfolgenden MS-induzierten Spaltung werden sowohl *Reporter*-Ionen als auch *Balancer*-Peptid-Konjugate,

sogenannte Komplementär-Ionen, gebildet. Die Quantifizierung der Peptide kann prinzipiell sowohl über die *Reporter*-Intensitäten als auch über die komplementären Ionen erfolgen, sofern die Isotopenmarkierung in der *Balancer*-Region nach der Spaltung beibehalten wird. Bei der Fragmentierung von TMT-markierten Peptiden verbleibt eine negative Ladung auf dem Peptid-*Balancer*-Konjugat. Somit wird der Ladungszustand der komplementären Ionen verringert. Im Gegensatz dazu ist die Fragmentierung des neuen isobaren SOT-Reagenzes ladungsneutral. Die entstehenden komplementären Ionen behalten ihre Ladung bei. Die komplementären Ionen des TMT-Duplex (TMT² 126 **44** und TMT² 127 **45**) sind ununterscheidbar, da sie während der Fragmentierung CO verlieren, welches eine Isotopenmarkierung enthält (Abbildung 28). Bei höher markierten TMT-Reagenzien wäre eine Unterscheidung jedoch möglich.

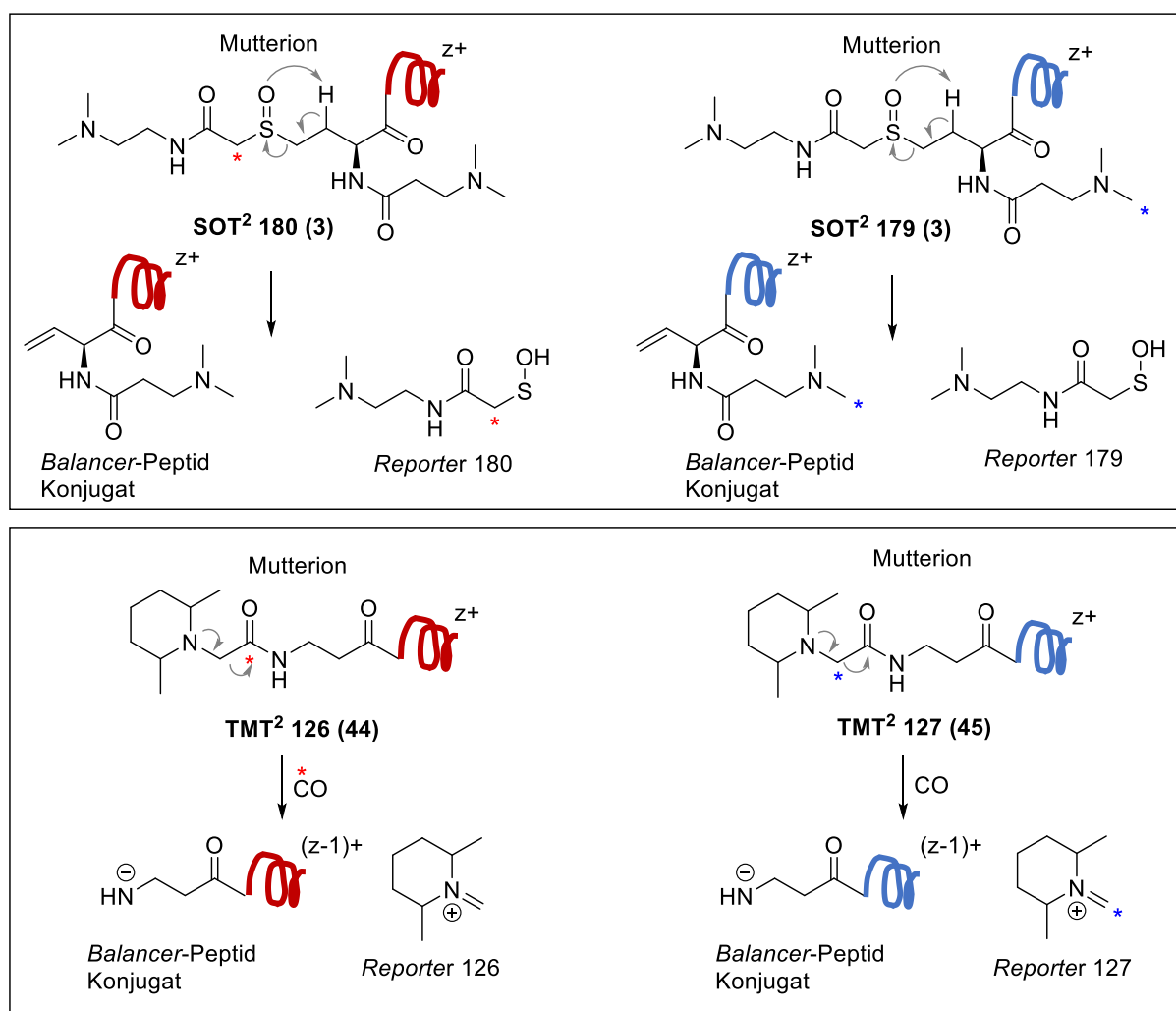


Abbildung 28 Vergleich der Fragmente, die bei der Spaltung der SOT- und TMT-markierten Peptide im MS²-Scan des Duplex-Experimentes entstehen. Die Fragmentierung SOT-markierter Peptide ist ladungsneutral. Bei der Spaltung TMT-markierter Peptide (beim TMT-Duplex) verbleibt eine negative Ladung auf dem *Balancer*-Peptid-Konjugat. Die komplementären Ionen sind folglich ununterscheidbar. Zudem wird der gesamte Ladungszustand der Komplementärionen von TMT reduziert.

Wie bereits erwähnt, kann die Quantifizierung sowohl an Hand der relativen Intensitäten der *Reporter*-Ionen als auch der Komplementär-Ionen erfolgen. Da die relative Quantifizierung der

Peptide im einfachsten Fall über die Bestimmung der *Reporter*-Ionen-Intensitäten erfolgt, wird zunächst auf die entstandenen *Reporter*-Ionen im durchgeführten Experiment eingegangen. Eine gute Sichtbarkeit der *Reporter*-Ionen ist essentiell für eine zuverlässige Quantifizierung. Abbildung 29 zeigt die Analyse aller Peptide, die im HEK-Experiment identifiziert wurden. Die Messungen wurden bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 28% HCD (*higher-energy collisional dissociation*) durchgeführt. Diese Energie ist ideal für die Peptid-Fragmentierung und eine nachfolgende Identifikation geeignet. Man kann eine deutliche Erhöhung der relativen *Reporter*-Ion-Intensitäten im SOT-Experiment gegenüber dem TMT-Experiment erkennen.

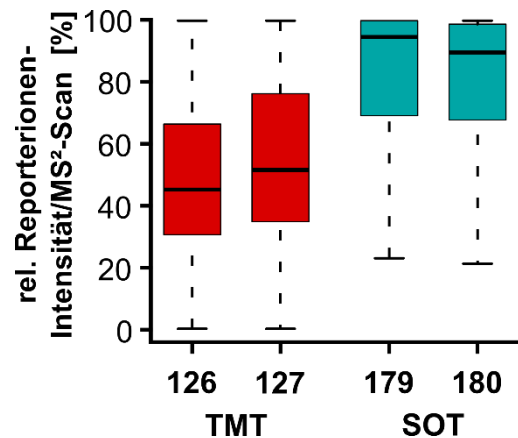


Abbildung 29 Statistische Analyse der relativen *Reporter*-Ionen Intensitäten im MS²-Experiment. Intensive *Reporter*-Ionen im SOT-Experiment. Die Abbildung stammt aus der Publikation.^[97]

Die relative Intensität der *Reporter*-Ionen der SOT-markierten Peptide beträgt in der Mehrzahl an MS²-Spektren beispiellose 70 bis 100%. Im TMT-Experiment hingegen ist der Median der Intensität mit 30 bis 75% geringer. Die gute Sichtbarkeit der *Reporter*-Ionen ist optimale Voraussetzung für eine Quantifizierung, welche anhand der *Reporter*-Ionen-Intensitäten erfolgt. Abbildung 30 zeigt exemplarisch die Fragmentierung eines SOT-markierten und eines TMT-markierten Peptids DLPEHAVLK²⁺ aus dem HEK-Lysat im direkten Vergleich. In dieser Abbildung kann man erneut die hohen *Reporter*-Ionen Intensitäten im SOT-Experiment erkennen. Das Signal des SOT-*Reporters* ist deutlich intensiver als das des TMT-*Reporters*. Zudem sind mehr Fragmente im SOT-Spektrum erkennbar, was vermuten lässt, dass das neue Sulfoxid-basierte Reagenz die Peptidfragmentierung fördert. Im Spektrum des TMT-Experimentes fällt das intensive intakte Mutterion neben dem schwachen *Reporter*-Signal ins Auge. Hingegen sind die SOT-*Reporter*-Ionen deutlich intensiver als das SOT-Mutterion.

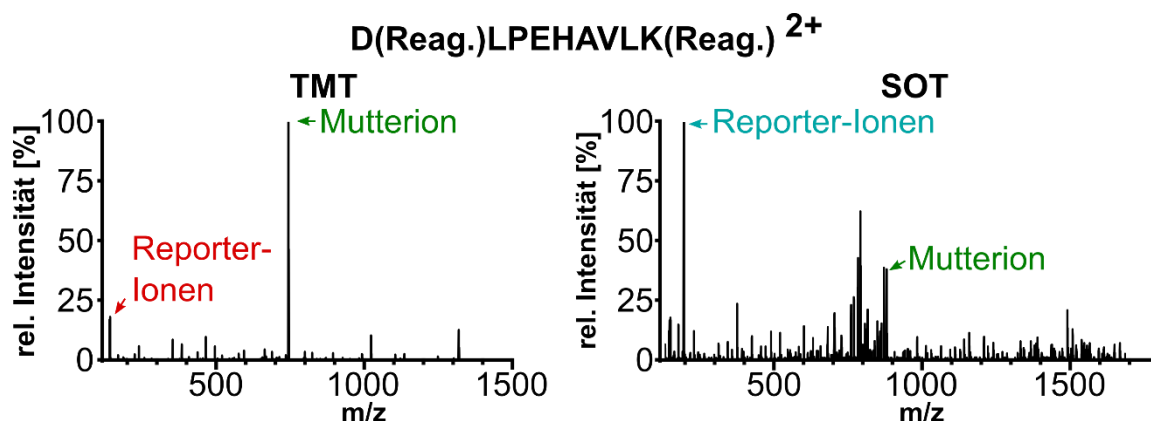


Abbildung 30 Vergleich der Fragmentierungseffizienz von SOT im Vergleich zu TMT an Hand des Beispielpeptides DLPEHAVLK²⁺. Die Fragmentierung des SOT-markierten Peptids, bei einer normierten Kollisionsenergie von 28% HCD, führt zu einem hohen *Reporter-Ion*-Signal. Reag. = umgesetztes Reagenz. Die Abbildung stammt aus der Publikation.^[97]

Neben der Entstehung intensiver *Reporter*-Ionen, wurde eine Erhöhung des allgemeinen Ladungszustandes SOT-markierter Peptide beobachtet. Abbildung 31 B zeigt die Ladungszustände der SOT- und TMT-markierten Mutterion-Peptide im MS¹-Scan im Vergleich. Über 65% aller SOT-markierten Peptide haben einen Ladungszustand von mindestens +3. Die TMT-markierten Peptide zeigen eine deutlich geringere Ladungsdichte. Die Erhöhung der Ladungszustände liegt im Reagenz-*Design* begründet (Abbildung 31 A). Die zwei basischen *tert*-Aminogruppen liegen in der Gasphase protoniert vor. Die Konjugation des SOT-Reagenzes an ein Peptid, erhöht die Ladungsdichte der Peptide. Eine hohe Ladungsdichte erleichtert die Fragmentierung im MS²-Scan. Folglich sollten im SOT-Experiment mehr *Reporter*-Ionen freigesetzt werden und eine größere Zahl an komplementären Ionen gebildet werden.

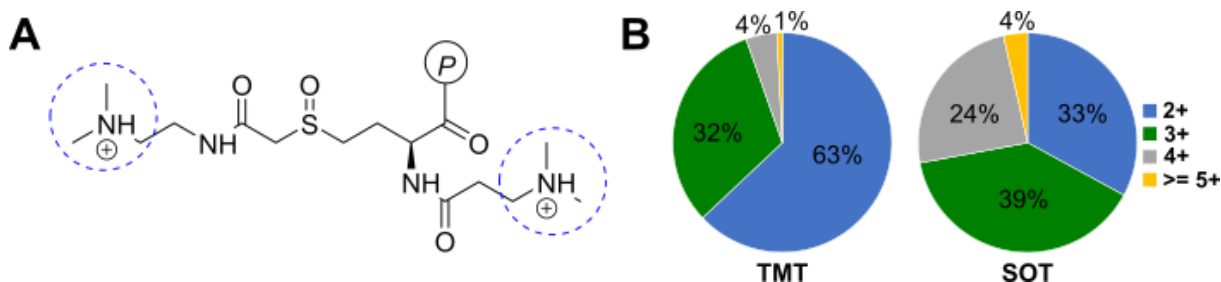


Abbildung 31 A) Protonierte Gruppen in der Gasphase führen zur Erhöhung des Ladungszustandes markierter Peptide. B) Ladungszustandsverteilung der SOT- und TMT-Mutterionpeptide. Es werden höhere Ladungszustände bei SOT-markierten Peptiden erreicht. Abbildung B stammt aus der Publikation.^[97]

Bei der Untersuchung der *Reporter*-Ionen Intensitäten, wurde bereits die effizientere Spaltung SOT-markierter Peptide gegenüber TMT-markierter Peptide deutlich (Abbildung 30). Auch die erhöhten Ladungszustände sollten zu einer effizienteren Spaltung führen. Um Aussagen über die Spaltungseffizienz treffen zu können, wurden die Daten hinsichtlich der Art und Häufigkeit entstandener Fragmente im MS²-Scan untersucht. Es wurde analysiert wie viele Peptidionen im MS²-Scan ohne *Reporter* vorliegen und wie viele der Peptidfragmente noch intaktes Reagenz tragen. Abbildung 32 zeigt die Verhältnisse aller identifizierten Fragmentionen in

Hinsicht darauf, ob die *Reporter*-abgespalten wurden oder nicht. Bei 42% der SOT Fragmentationen wurde der *Reporter* tatsächlich abgespalten. Im Fall von TMT liegen nur 15% der markierten Peptidfragmente ohne *Reporter* vor. Der gespaltene Anteil führt zur Entstehung von Komplementärionen-Clustern, welche ebenfalls zur Peptid-Quantifizierung herangezogen werden können. Das ausgeglichene Verhältnis von nahezu 1:1, an 58% nicht gespaltenem zu 42% abgespaltenem *Reporter*, ermöglicht eine gleichzeitige Identifizierung der intakten Peptide sowie eine Quantifizierung über die entstehenden Komplementärionen-Cluster.

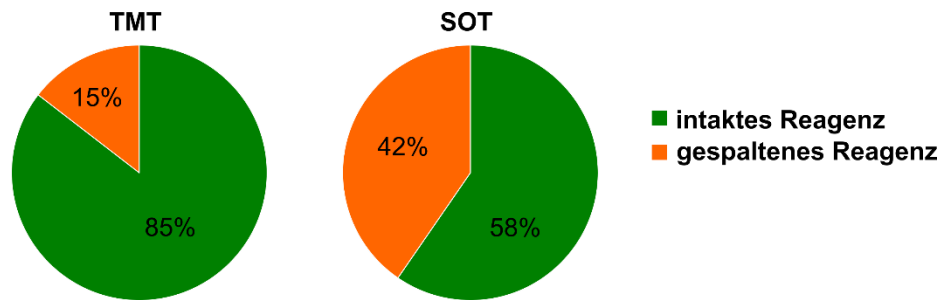


Abbildung 32 Verhältnis aller identifizierter Fragmentationen die entweder das intakte Reagenz tragen oder in denen der *Reporter* abgespalten wurde, was zur Entstehung von Komplementärionen-Clustern führt. Die Abbildung stammt aus der Publikation.^[97]

Wie bereits erwähnt, findet bei der MS-Spaltung nicht nur die Sulfoxidspaltung zur Generierung der *Reporter*-Ionen sondern auch eine Spaltung des Peptidrückgrates statt. Somit entstehen pro SOT-markiertem Peptid mehrere Komplementärionen, die sogenannten Komplementärionen-Cluster. SOT-markierte Peptide bilden mehr komplementäre Ionen als TMT-markierte Peptide (Abbildung 33 A). Außerdem ist der Median der relativen Intensitäten im MS²-Spektrum höher (Abbildung 33 B).

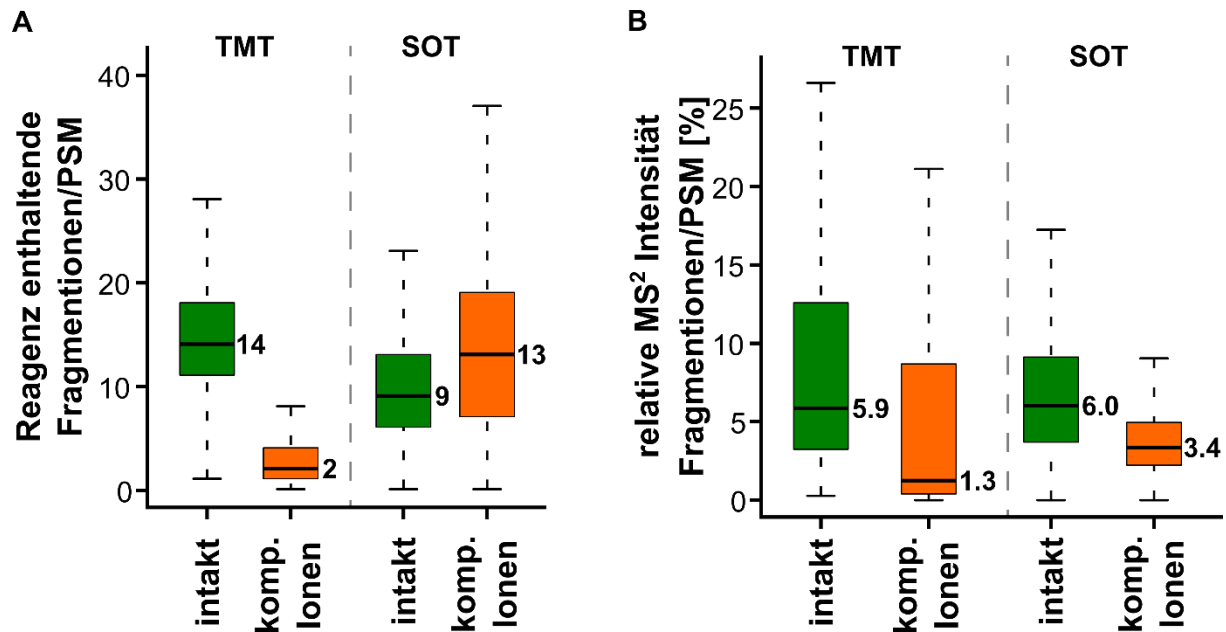


Abbildung 33 A) Statistische Analyse der Anzahl markierter Fragmentionen per Peptidordnung pro Spektrum (PSM, *peptide spectral match*). Es wird ein deutlicher Anstieg an komplementären Ionen SOT-markierter Peptide im Vergleich zu TMT-markierten Peptiden beobachtet. B) Statistische Analyse der relativen Intensitäten markierter Fragmentionen per PSM im MS²-Scan. Höherer Median der Signalintensitäten der SOT^c-Cluster gegenüber der TMT^c-Cluster. Die Abbildung stammt aus der Publikation.^[97]

Im Durchschnitt werden im SOT-Experiment 13 Peptid-*Balancer*-Fragmente pro Mutterion gebildet, das entspricht 6-7 Komplementärionen-Clustern pro Peptid. Die höhere Anzahl an Komplementärionen-Clustern hat zwar den Nachteil, dass die Datenauswertung komplexer wird, es stehen jedoch auch mehr Datenpunkte zur Quantifizierung zur Verfügung, wodurch potenzielle Quantifizierungsfehler minimiert werden könnten. Abbildung 34 zeigt ein Beispiel MS²-Spektrum des markierten Peptids EILIPVK⁴⁺. Die Signale der entstehenden *Reporter*-Ionen (rot) sowie der sieben Komplementärionen-Cluster (orange) zeigen intensive Signale. Zur Peptid-Identifikation stehen ebenfalls ausreichend Ionen (grau) zur Verfügung.

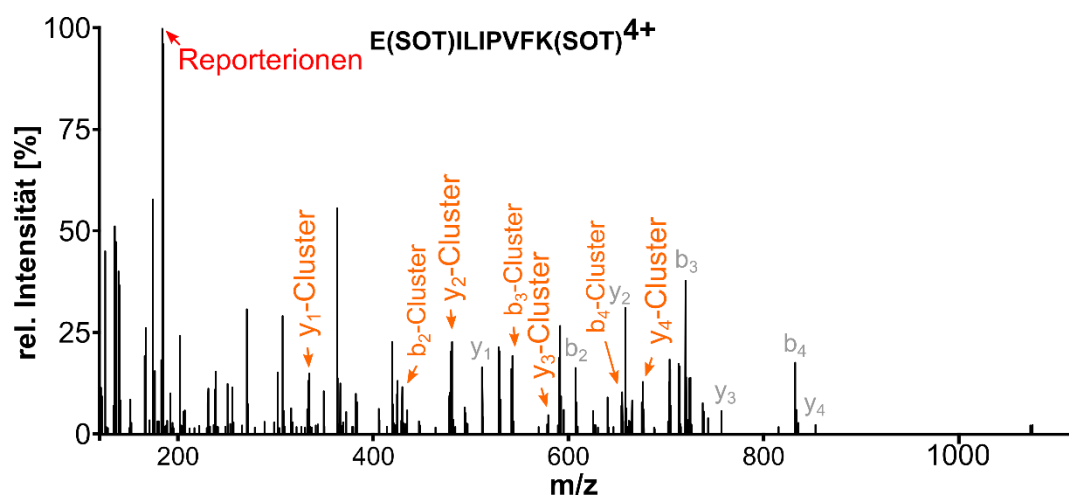


Abbildung 34 Beispiel-Spektrum des markierten Peptids EILIPVK⁴⁺, das die *Reporter*-Ionen (rot), Komplementärionen-Cluster (orange) und Fragmentionen zur Peptididentifizierung (grau) zeigt. Die Abbildung stammt aus der Publikation.^[97]

Zusammenfassend zeigt das durchgeführte *Bottom-Up* Experiment mit dem HEK-Lysat im Wesentlichen folgende Vorteile des neuen SOT-Markierungsreagenz gegenüber dem kommerziell erhältlichen TMT-Reagenz:

- 1) Ladungsneutrale Fragmentierung ohne Verlust der Isotopenmarkierung
- 2) SOT fragmentiert effizient bei niedriger Energie als TMT
- 3) Höhere Intensität und somit gute Sichtbarkeit der *Reporter*-Ionen
- 4) Höhere Ladungszustände der Mutterionen im MS¹-Scan
- 5) Größere Anzahl an Peptid-Fragmenten im MS²-Scan

Das beschriebene Experiment konnte zeigen, dass das neue SOT-Reagenz sowohl eine Peptidquantifizierung über die intensiven *Reporter*-Ionen ermöglicht, als auch über die entstehenden Komplementärionen-Cluster. Die beobachteten höheren Ladungszustände führen zu einer besseren Peptidfragmentierung.

3.1.6.2 Untersuchung des *Ratio-Compression* Effektes

Die derzeitig größte Herausforderung der Quantifizierung mit isobaren Markierungsreagenzien ist die sogenannte *ratio-compression*, die Verfälschung der Mengenverhältnisse zu kleineren Werten. Im Kapitel 1.3.3.3 wird genauer auf dieses Problem sowie veröffentlichte Lösungsansätze eingegangen. Insbesondere bei komplexen Protein-Mischungen ist ein starker *ratio-compression* Effekt erkennbar. Um zu evaluieren, ob das neue SOT-Reagenz die Verzerrung der Mengenverhältnisse (*ratio compression*) verringern kann, wurde ein Duplex-Experiment mit Rinderserumalbumin (BSA) vor einem HEK-Lysat als Verzerrungshintergrund durchgeführt. Im Vergleich wurde das gleiche Experiment mit dem kommerziell erhältlichen TMT-Duplex durchgeführt. So soll der Einfluss der Koisolierung und Kofragmentierung von HEK-„Stör-Peptiden“ zusammen mit den BSA-Ziel-Peptiden, untersucht werden. Als Hintergrund für das markierte Rinderserumalbumin (BSA), wurde markiertes humanes HEK-Lysat in einem 1:1-Verhältnis gemischt. Zu diesem Peptid-Hintergrund, wurde eine kleine Menge an 4:1-markiertem BSA gegeben (1 pmol BSA auf 1 µg HEK Lysat). Durch die hohe Menge an HEK-Hintergrund sollte eine große Verzerrung der gemessenen BSA-Peptid-Verhältnisse sichtbar sein. Im Einklang mit diesen Erwartungen, ist bei der Quantifizierung über die *Reporter*-Ionen Verhältnisse eine massive Verzerrung der Verhältnisse in Richtung 1:1 sichtbar. Diese Verzerrung wurde bereits in ähnlichen Datensätzen beobachtet.^[54] Im TMT Experiment liegt der Median der normierten *Reporter*-Ionen Verhältnisse bei 1.11, bei unserem neuen SOT-Reagenz bei 1.15.

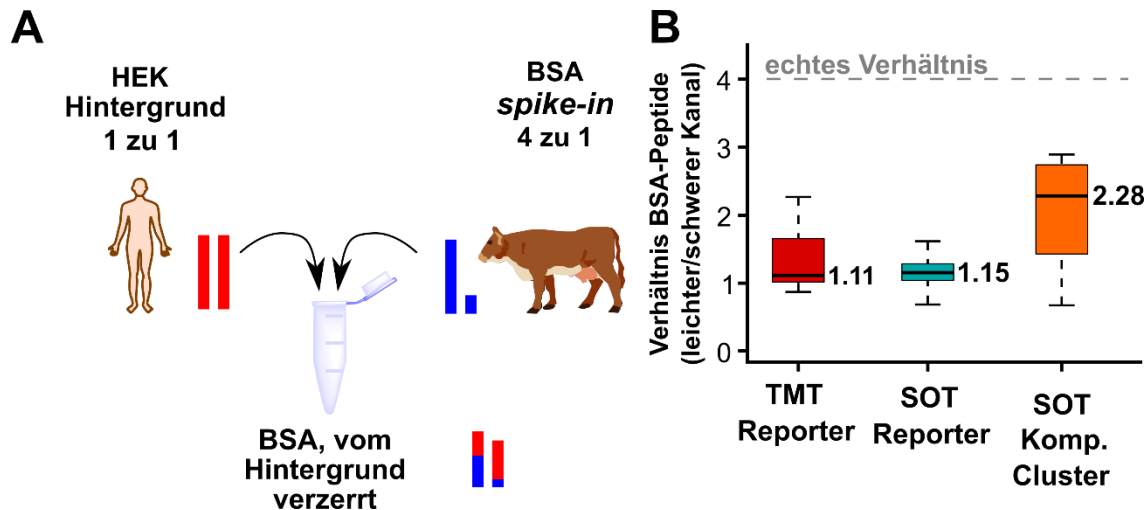


Abbildung 35 A) Experiment zur Proteinquantifizierung, dass die starke Verzerrung der gemessenen Intensitätsverhältnisse zeigt. Markiertes HEK-Lysat (1:1) dient als Verzerrungshintergrund. Markiertes BSA (4:1) wird dem Hintergrund beigegefügt. B) Quantifizierungsdaten der BSA-Peptide vor dem HEK-Hintergrund. Der Median der Reporterion-Intensitäten zeigt starke Verzerrung zu 1:1, sowohl bei den SOT- als auch den TMT-Daten. Die Analyse der Komplementärionen-Cluster führt zu einem weniger verzerrten Verhältnis. Die Abbildung wurde der Veröffentlichung entnommen.^[97]

Neben der Quantifizierung über die *Reporter*-Ionen Intensitäten ist jedoch auch eine Bestimmung der Mengenverhältnisse über die komplementären Ionen möglich. Bei der Quantifizierung über Komplementärionen-Cluster wird die Verzerrung der gemessenen Verhältnisse reduziert, da diese auf Grund des jeweiligen Peptidrestes im Gegensatz zu den *Reporter*-Ionen unterscheidbar sind. Die *Reporter*-Ionen sind für alle Peptide identisch, somit fällt die Koisolierung und Kofragmentierung störender Ionen zusammen mit dem Ziel-Ion stärker ins Gewicht. Um die prognostizierte Verminderung des Verzerrungseffektes zu bestätigen, wurde der gleiche Datensatz hinsichtlich der Komplementärionen-Cluster untersucht. Bei der Quantifizierung über die TMT-Daten, stehen im Fall des Duplex-Reagenzes nur die Informationen der *Reporter*-Ionen-Intensitäten zu Verfügung (im TMT-Sixplex wäre es möglich). Bei der Spaltung im Massenspektrometer wird CO abgespalten, welches eine Isotopenmarkierung enthält (siehe Abbildung 28). Somit enthalten die Komplementärionen keine quantitativen Informationen. Im Fall unseres SOT-Reagenz 1 wurden in 17 quantifizierten Peptiden 155 komplementäre Ionen-Cluster gefunden und für die Quantifizierung herangezogen. Mit einem ermittelten Verhältnis von 2.3:1 liegt das bestimmte Verhältnis um den Faktor 2 näher am erwartetem 4:1-Verhältnis (Abbildung 35 B) Somit konnte gezeigt werden, dass die Verzerrung der Verhältnisse in komplexen Proben, durch Quantifizierung über die komplementären Ionen im SOT-Experiment, deutlich vermindert werden kann.

3.1.7 Änderung des Reagenzdesigns zur Reduktion der Datenkomplexität

Das neue isobare Markierungsreagenz ermöglicht eine Peptidquantifizierung über intensive *Reporter*-Ionen. Zudem ist eine Quantifizierung über Komplementärionen möglich, wodurch der Verhältnis-Verzerrungseffekt deutlich verringert werden kann. Jedoch haben die

massenspektrometrischen Experimente gezeigt, dass noch Entwicklungsbedarf beim Reagenzdesign bezüglich der Datenauswertung besteht. In den Experimenten fiel vor allem auf, dass das neue Reagenz zu unspezifischer Markierung tendiert und dass die Effizienz der Markierung (*labeling efficiency*) gesteigert werden muss. Deshalb wurde eine um 10% niedrigere Identifikationsrate als bei TMT beobachtet. Des Weiteren sind die Daten enorm komplex, was die softwaregestützte Datenauswertung erschwert. Die Daten haben gezeigt, dass eine Markierung mit dem Reagenz die Fragmentierung der Peptidbindungen begünstigt. Diese wird zwar angestrebt, um über die Komplementär-Cluster quantifizieren zu können. Jedoch führt eine starke Fragmentierung der Peptidbindungen auch zu komplexeren Daten. Daher soll untersucht werden, ob eine geringere Ladungsdichte der Mutterionen oder eine langsamere Sulfoxidfragmentierung zur Reduktion der Datenkomplexität führt. Zur Reduktion der Datenkomplexität wurden zunächst zwei Strategien entwickelt:

- 1) Geringere Fragmentierungstendenz dank einer β -NHAc Gruppe in β -Position zum Sulfoxid
- 2) Weniger protonierbare Gruppen im Molekül zur Verminderung der Ladungsdichte und kleinere Molekülgröße zur Reduktion der Fragmentierungsmöglichkeiten

Es sollten zunächst vereinfachte Testmoleküle dargestellt werden, um den Effekt der Änderungen massenspektrometrisch evaluieren zu können. Im Anschluss sollte die Struktur hinsichtlich der Möglichkeit zum höheren Multiplexing überarbeitet werden. Abbildung 36 zeigt den Entwurf zweier neuer Strukturen. Das Design basiert in beiden Fällen auf der Vereinfachung der *Balancer*-Region. **46** trägt eine NHAc Gruppe in β -Position zum Sulfoxid. Durch den zusätzlichen Substituenten in β -Stellung zum Sulfoxid erhofften wir uns eine Verlangsamung der Sulfoxidfragmentierung. Es stehen weniger β -H Atome zur Spaltung zur Verfügung. Mit **47** wollten wir den Ladungszustand und somit die Fragmentierung der Peptidbindungen durch eine geringere Anzahl an protonierbaren Gruppen reduzieren. Zudem ist die gesamte Molekülgröße deutlich verringert.

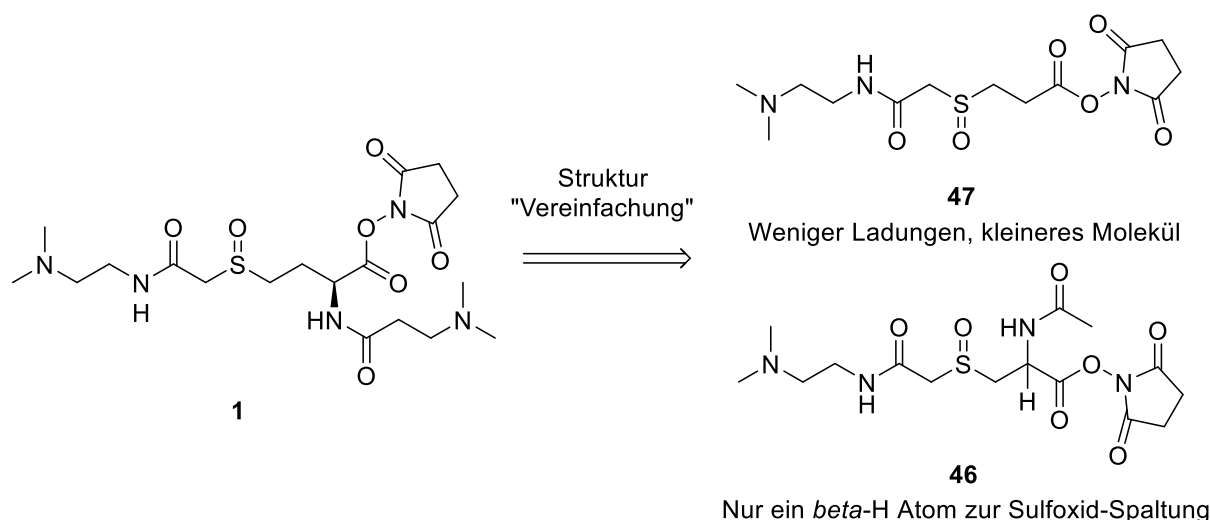
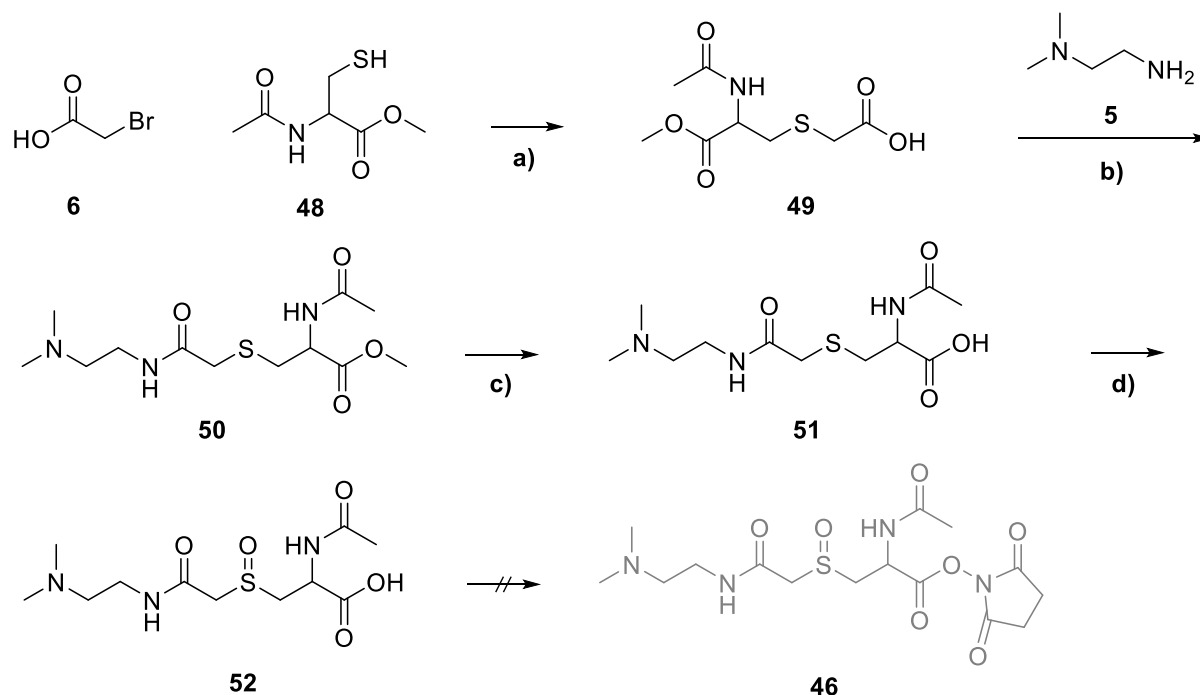


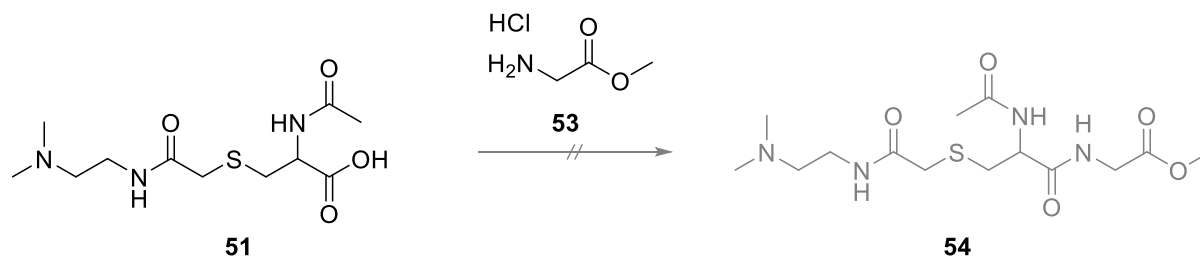
Abbildung 36 Entwurf zweier Testmoleküle **46** und **47** zur Reduktion der Datenkomplexität. **46** trägt eine NHAc Gruppe in β -Stellung zum Sulfoxid. **47** hat weniger protonierbare Gruppen.

Für die Synthese von Reagenz **46** mit NHAc-Gruppe in β -Stellung zum Sulfoxid, wurde die Strategie aus Schema 25 getestet. *N*-Acetyl-*L*-cystein Methylester **48** und Bromessigsäure **6** wurden in einer nukleophilen Substitution mit Triethylamin in einer Ausbeute von 93% zu **49** umgesetzt. Die Amidierung mit *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin **5** lieferte **50** in einer Ausbeute von 74%. Nach quantitativer Verseifung des Methylesters **50** mit LiOH, wurde **51** mit *m*CPBA in einer Ausbeute von 43% zum Sulfoxid **52** oxidiert.



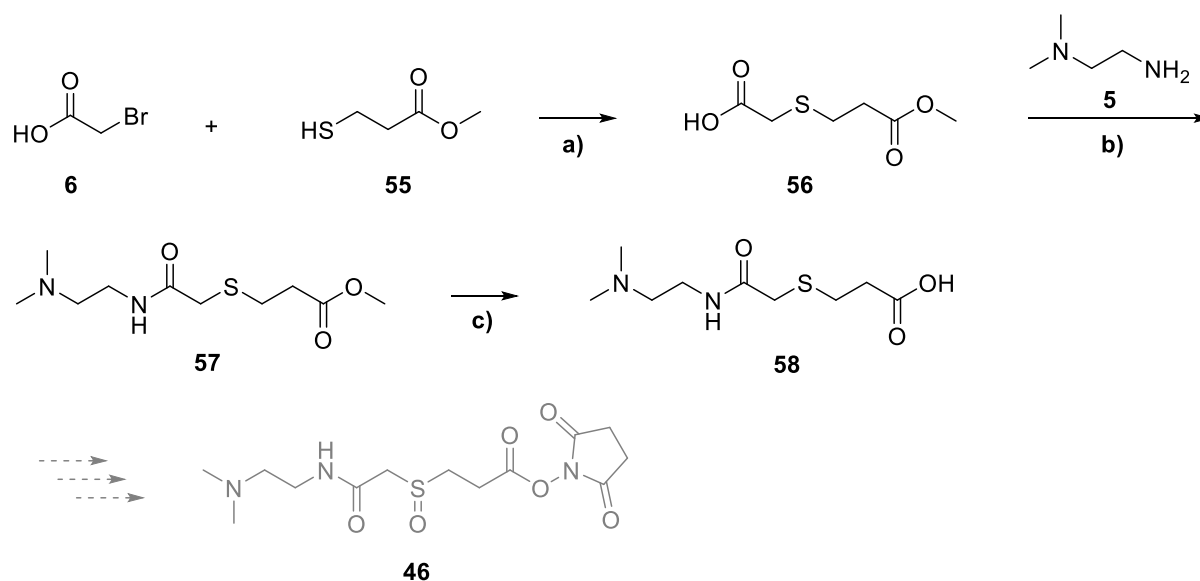
Schema 25 Route zur Synthese von Reagenz **46**, mit NHAc-Gruppe in β -Position zum Sulfoxid. a) *N*-Acetyl-*L*-cystein Methylester **48** (1.0 Äq), Bromessigsäure **6** (1.0 Äq), NEt₃ (1.5 Äq), DMF, 12 h, RT, 93% b) *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin **5**, EDC-HCl (1.1 Äq), HOBt (1.1 Äq), NEt₃ (1.7 Äq), DMF, 12 h, RT, 74% c) LiOH (3.0 Äq), THF/H₂O (4:1), quantitativ d) *m*CPBA (1.0 Äq), pH = 2 (2M HCl), H₂O/DMF (4:1), 0 °C → RT, 1 h, 43%.

Das erhaltene Sulfoxid **52** sollte schließlich mit NHS-TFA **27** zum finalen NHS-Ester **46** umgesetzt werden. Die Darstellung des aminreaktiven NHS-Esters **46** mit NHS-TFA **27** und Pyridin in DMF war jedoch nicht möglich. Um zu testen, ob die sterische Abschirmung der NHAc-Gruppe eine Umsetzung verhindert, wurde Glycinmethylester **53** als *Linker* getestet. Eine Peptidkupplung von **51** mit **53** zu Amid **54** war jedoch weder mit EDC·HCl und HOBt noch mit pyBOP erfolgreich (Schema 26).



Schema 26 Keine Reaktion bei der getesteten Umsetzung von Säure **51** mit Glycinmethylester Hydrochlorid **53** (1.0 Äq) als Linker. HOBt (1.1 Äq), EDC·HCl (1.1 Äq), NEt₃ (1.7 Äq), DMF, 60 °C.

Da die Synthese der stark vereinfachten Struktur **47** sehr vielversprechend war, wurde die Strategie einen Substituenten in β -Position einzufügen, um die Sulfoxidfragmentierung zu verlangsamen, im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Die vereinfachte Struktur scheint vielversprechender bezüglich des Ziels der Verringerung der Datenkomplexität. Die Einführung einer weniger gehinderten Methylgruppe anstelle der getesteten NHAc-Gruppe in β -Position zum Sulfoxid, wäre eine denkbare Alternative zur Stabilisierung des Sulfoxids. Für die Synthese des stark vereinfachten Testmoleküls **47** mit weniger protonierbaren Gruppen und geringerer Molekülgröße, wurde die Route aus Schema 27 getestet. Der erste Schritt der Synthese war die nukleophile Substitution von 3-Mercaptopropionsäure Methylester (**55**) mit Bromessigsäure (**6**) zur Darstellung von **56** (83%). Die resultierende Säure **56** wurde mit *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin (**5**) in Amid **57** umgewandelt (68%). Durch quantitative Verseifung des Methylesters wurde die freie Säure **58** in hoher Reinheit erhalten.



Schema 27 Synthese der Säure **58** zur Darstellung des Test-Reagenz **46**. a) 3-Mercaptopropionsäure Methylester **55** (1.0 Äq), Bromessigsäure (**6**) (1.0 Äq), NEt_3 , in DMF, 12 h, RT, 83%; b) *N,N*-Dimethylethandiamin (**5**) (1.0 Äq), EDC·HCl (1.1 Äq), HOBT (1.1 Äq), NEt_3 (1.7 Äq), DMF, 12 h, RT, 68%; c) LiOH (3.0 Äq), THF/H₂O (4:1), quantitativ.

Reagenz **46** kann einfach durch Oxidation mit *m*CPBA und Umsetzung mit NHS-TFA **27** nach optimierter Synthese aus Abschnitt 3.1.3 dargestellt werden. Die Synthese von Test-Reagenz **46** wird von JANA BOGENA fortgesetzt.

3.2 Zusammenfassung und Ausblick

Derzeitig verwendete isobare Markierungsreagenzien müssen hinsichtlich ihrer Sensitivität und Präzision verbessert werden. Für eine effiziente Spaltung zur Generierung intensiver *Reporter*- sowie Komplementär-Ionen, wurde im Arbeitskreis ein Sulfoxid-basiertes Markierungsreagenz **1** entwickelt. Für die gleichzeitige Untersuchung zweier Proben ist jedoch die Synthese zweier isotopenmarkierter Varianten, einem sogenannten Duplex, nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ¹³C-markierte Reagenz SOT 179 **2** erfolgreich dargestellt. Die isotopologe Struktur SOT 180 **3** wurde von *Jana Bogena* synthetisiert.

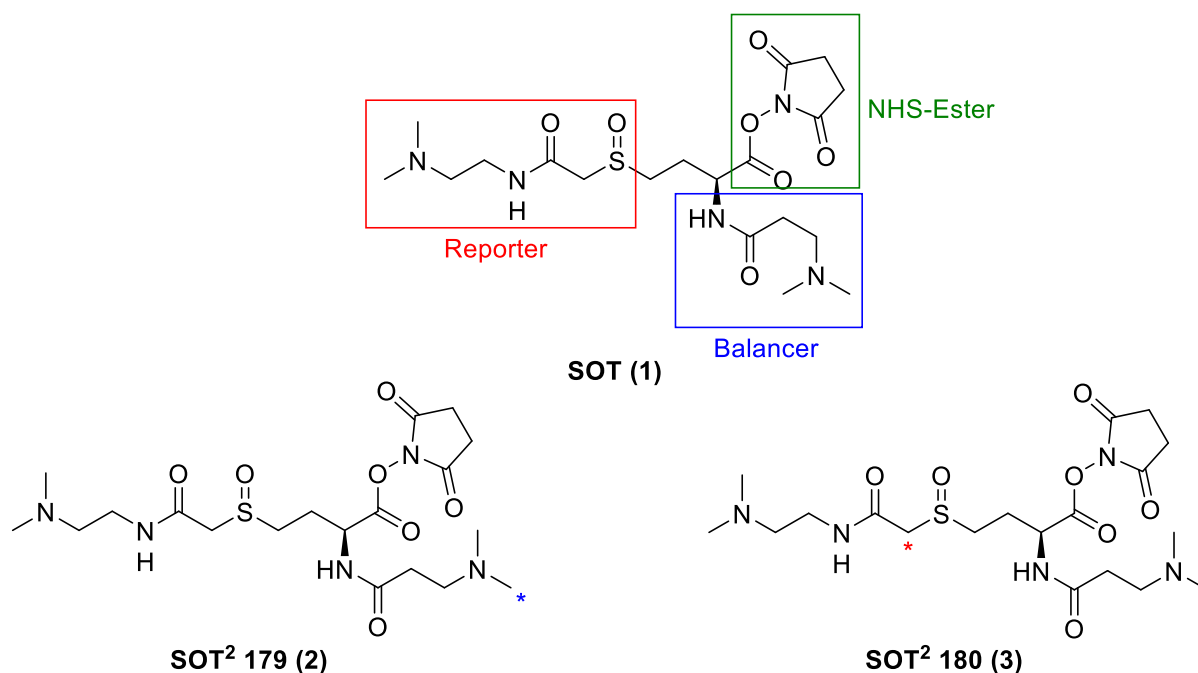


Abbildung 37 Entwurf des neuen isobaren Markierungsreagenz **1** – mit *Balancer*-Region, *Reporter*-Gruppe und Amin-reaktiver NHS-Ester Funktionalität. Sowie des ^{13}C -markierten SOT-Duplex bestehend aus SOT² 179 **2**, mit Isotopenmarkierung in der *Balancer*-Region, und dem isotopologen SOT² 180 **3**, mit Isotopenmarkierung im *Reporter*.

Die ursprünglich verwendete problematische Syntheseroute zur erstmaligen Darstellung des unmarkierten Reagenzes **1**, konnte in dieser Arbeit deutlich verbessert werden. Auf Grund der äußerst niedrigen Ausbeute und geringen Reinheit war die ursprüngliche Route für die Darstellung des Reagenzes ungeeignet. Die Verbesserung der ursprünglichen Syntheseroute lag insbesondere in den folgenden Punkten:

- *in situ* Reduktion zu Thiol sowie Entwicklung einer neuen Schutzgruppenstrategie zur Verbesserung des Alkylierungsschrittes
- Optimierung der Reaktionsbedingungen der zweiten Amidierung zur Vermeidung schlecht-abtrennbarer Nebenprodukte
- Reproduzierbare Bedingungen für eine kontrollierten Oxidation zum Sulfoxid
- Zusätzlicher Entsalzungsschritt zur Steigerung der Derivatisierungseffizienz

In dieser Arbeit wurde das ^{13}C -markierte Reagenz SOT 179 **2** mit Isotopenmarkierung im *Balancer* einer Gesamtausbeute von 12% über 9 Schritte dargestellt. Über den optimierten Weg kann auch die effiziente Darstellung des unmarkierten Reagenz **1** sowie der von SOT 180 **3**, mit Isotopenmarkierung im *Reporter*, erfolgen.

Die neue Syntheseroute ist optimal für die Darstellung von **1** und **3** geeignet. Jedoch ist die Route nicht optimal für die kostengünstig Herstellung größerer Mengen an SOT² 179 **2**, dem Reagenz mit Isotopenmarkierung im *Balancer*. Daher wurde zur Darstellung von **2** auf Basis der optimierten Route eine neue kosteneinsparende Synthesestrategie entwickelt. Durch späteren Einbau der ^{13}C -Markierung, kann aus einer Ampulle ^{13}C -Formaldehyd (6.45 mmol)

die 3,9-fache Menge an SOT² 179 **2** hergestellt werden. Die Synthese von **2** erfolgt auf diesem Weg in einer Gesamtausbeute von 7% über 11 Schritte.

Für die gleichzeitige Untersuchung dreier Proben, wurde zudem eine Strategie zur Darstellung der zweifach ¹³C-markierten Version SOT³ 179 **34** entwickelt. Da die massenspektrometrischen Experimente (3.1.6) jedoch zeigten, dass das Reagenzdesign überarbeitet werden muss, wurde die Synthese nur bis zur freien Säure **43** durchgeführt. Die Strategie der Einführung zweier ¹³C-Markierungen kann jedoch auch auf ein überarbeitetes Reagenzdesign angewandt werden, sofern die Struktur der *Reporter*-Gruppe beibehalten wird.

Die Evaluierung des Reagenzes durch *Michael Stadlmeier* konnten zeigen, dass das neue SOT-Reagenz im Wesentlichen folgende Vorteile gegenüber dem kommerziell erhältlichen TMT-Reagenz hat:

- 1) Ladungsneutrale Fragmentierung ohne Verlust der Isotopenmarkierung
- 2) SOT fragmentiert effizient bei niedriger Energie als TMT
- 3) Höhere Intensität und somit gute Sichtbarkeit der *Reporter*-Ionen
- 4) Höhere Ladungszustände der Mutterionpeptide im MS¹-Scan
- 5) Größere Anzahl an Peptid-Fragmenten im MS²-Scan

Das beschriebene Experiment konnte zeigen, dass das neue SOT-Reagenz sowohl eine Peptidquantifizierung über die intensiven *Reporter*-Ionen ermöglicht, als auch über die entstehenden Komplementärionen-Cluster. Mit dem neuen Reagenz kann man den bekannten Quantifizierungsfehler, die Verzerrung der gemessenen Verhältnisse zu kleineren Werten (*ratio distortion*), reduzieren indem man die Peptidmengen über die generierten Komplementär-Ionen bestimmt.

Die Messungen zeigten jedoch auch, dass noch Verbesserungsbedarf hinsichtlich des Reagenzdesigns und der Datenauswertung, also der Entwicklung besserer Software, besteht. Es wurden zwei vereinfachte Testmoleküle entworfen, um zu testen welchen Einfluss die Änderungen auf die Komplexität der Daten haben.

Ein Testmolekül **46** trägt eine NHAc-Gruppe in β -Position zum Sulfoxid, wodurch eine geringere Fragmentierungstendenz erwartet wird. Das zweite Testmolekül **47** trägt weniger protonierbare Gruppen im Molekül und besitzt eine kleinere Molekülgröße. Die Synthese von **46** war auf dem getesteten Weg nicht möglich. An Stelle einer NHAc-Gruppe könnte man in Zukunft jedoch eine Methylgruppe in β -Position zum Sulfoxid testen. Die Synthese des stark vereinfachten Moleküls **47** wurde bis zur freien Säure **58** erfolgreich durchgeführt. Die Synthese sowie die anschließende Evaluierung des überarbeiteten Reagenzdesigns werden von *Jana Bogen* und *Michael Stadlmeier* fortgesetzt.

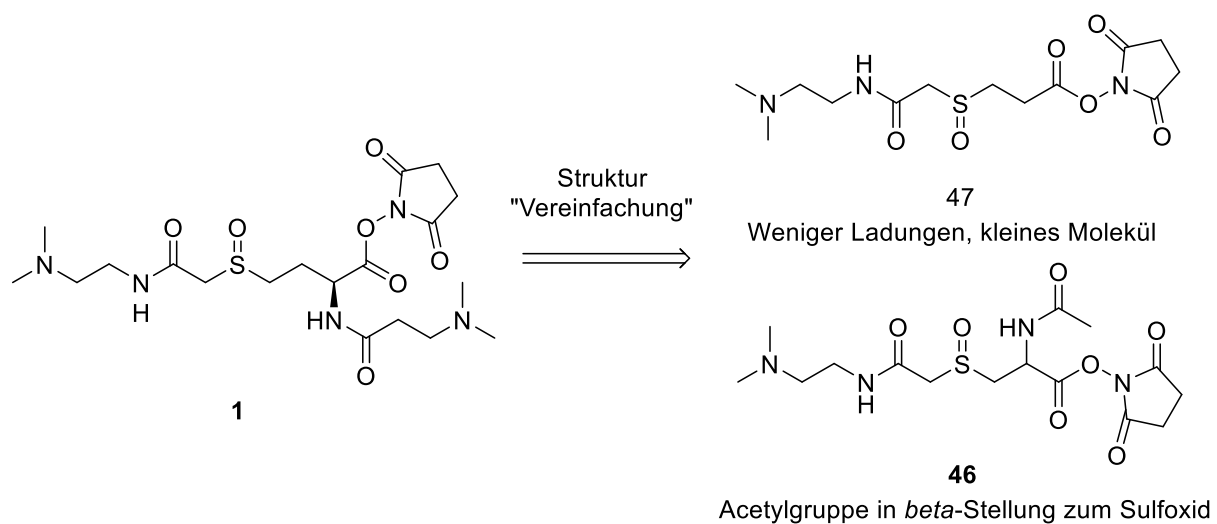


Abbildung 38 Entwurf zweier Testmoleküle **46** und **47** zur Reduktion der Datenkomplexität. **46** trägt eine NHAc-Gruppe in β -Stellung zum Sulfoxid. **47** hat weniger protonierbare Gruppen.

3.3 Keton/Aldehyd-reaktives Derivatisierungsreagenz zur Sensitivitätssteigerung schlecht ionisierbarer Analyten

3.3.1 Entwurf und Synthese eines neuen Sulfoxid-basierten Derivatisierungsreagenz

LC/ESI-MS/MS ist eine leistungsfähige Technologie der Spurenanalytik.^[100-101] Eine schlechte Ionisierungseffizienz, schwache Fragmentierung, Signalsuppressionen sowie hohes Hintergrundrauschen („chemical noise“) limitieren jedoch Detektion und Quantifizierung einiger Ziel-Analyten.^[65] Um das chromatographische Verhalten und die Fragmentierungseigenschaften der Analyten zu verbessern sowie deren Ionisierungseffizienz zu erhöhen, kann man sich der Methode der chemischen Derivatisierung bedienen (siehe 1.7).^[64-65] Ketone und Aldehyde sind neutrale funktionelle Gruppen, daher ist die Ionisierungseffizienz von Keto-Verbindungen oftmals recht niedrig. Wie unter 1.7 beschrieben, stehen für die Derivatisierung von Keto-Analyten eine Reihe an Reagenzien zur Verfügung. Derzeit werden vor allem Reagenzien mit permanent geladenen Gruppen wie *Girard's T* Reagenz (**59**) und das *Amplifex*® Reagenz (**60**) in der Analytik eingesetzt (Abbildung 39). Da Oxime den Semicarbazonen hinsichtlich der hydrolytischen Stabilität überlegen sind, wird das *Girard T* Reagenz (**59**) jedoch seltener eingesetzt, als das *Amplifex*® Reagenz (**60**). Zudem werden bei der Fragmentierung von Hydrazin-Reagenzien unspezifische Fragmentionen gebildet, welche die Signalintensitäten der relevanten Produktionen vermindert und somit zu einer geringeren Signalverstärkung führen.^[66] Um höhere Signalintensitäten in der LC/ESI-MS/MS Analytik zu erhalten, wurde im Arbeitskreis *Carell* ein neues Hydroxylamin-basiertes Reagenz **61** zur Detektion abasischer Stellen entwickelt,^[74] das eine massenspaltbare Triazoleinheit enthält (Abbildung 39). Im MS/MS-Experiment findet ein zusätzlicher Isolierungs- und Fragmentierungsschritt statt (1.4). Aus dem resultierenden Produkt-Ionen-Spektrum (MS²) kann die Struktur des Vorläufers eindeutig abgeleitet werden. Durch den Einbau einer massenspaltbaren Gruppe werden im Massenspektrometer intensive Tochterionen erzeugt, welche die Sensitivität der Methode verbessern (1.6). Mit der Einführung einer permanenten Ladung muss der Analyt nicht mehr ionisiert werden. Verluste durch schlechte Ionisationseffizienzen werden somit ausgeschlossen (1.7). Zusätzlich trägt die Derivatisierung mit dem Reagenz **61** außerdem zu einer besseren Wasserlöslichkeit bei.

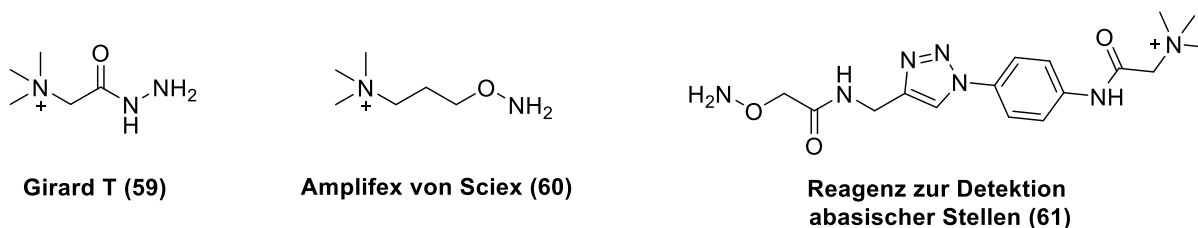


Abbildung 39 Reagenzien **59**, **60** und **61** zur Derivatisierung von Keto-Analyten.

Neben der Anwendung zur Quantifizierung abasischer Stellen wurde das neue Reagenz **61** im Arbeitskreis *Carell* bereits in ersten Experimenten für die Anwendung in der Hormondiagnostik getestet. Als Testanalyt wurde das Steroid Testosteron (**62**) gewählt. Eine zuverlässige Mengenbestimmung von Testosteron (**62**) ist unerlässlich für die Diagnose, Behandlung und Prävention einer Reihe von hormonbedingten Erkrankungen bei Erwachsenen und Kindern, wie Hypogonadismus^[102], PCOS (*polycystic ovary syndrom*)^[103], Androgenmangel bei Männern^[104], bei bestimmten Krebsarten^[105], Diabetes^[106], Osteoporose^[107] oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen.^[106] Erste Messungen des Testosteron-Reagenz-Adduktes **63** (Abbildung 40) zeigen eine Herabsetzung der Nachweisgrenze.

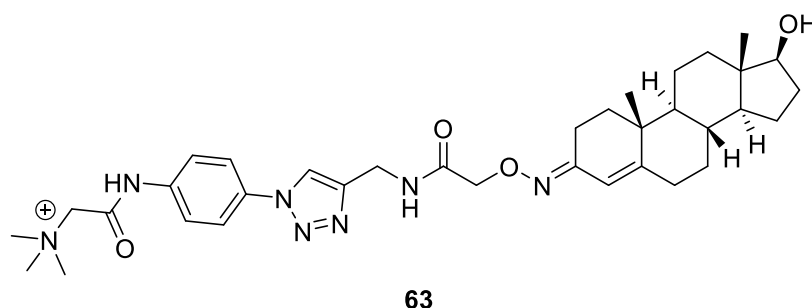


Abbildung 40 Testosteron-Addukt **63** wird durch Umsetzung von Testosteron **62** mit Reagenz **61**, das zur Detektion abasischer Stellen im Genom entwickelt wurde, hergestellt. Derivatisierungsbedingungen: 0.5% Ameisensäure in einem 1:1:1-Gemisch aus H₂O/MeOH/MeCN, 60 °C, 1h, RT für 12 h.

Um die Detektionsgrenzen der Spurenanalytik noch weiter herabzusetzen, sollte ein neues massenspaltbares Reagenz entwickelt werden. Die Sensitivität der Methode ist unter anderem von der Spaltungseffizienz im Massenspektrometer abhängig. Da sich das Sulfoxid bereits im neuen isobaren Markierungsreagenz **1** (Absatz 3.1) als ideale massenspaltbare Gruppe bewiesen hat, sollte das neue Derivatisierungsreagenz zur Sensitivitätssteigerung ebenfalls ein Sulfoxid als spaltbare Gruppe tragen. Unter Berücksichtigung chemischer und analytischer Aspekte wurde Reagenz **64** entwickelt, das massenspaltbar und Hydroxylamin-basiert ist (Abbildung 41). Reagenz **65** dient als erstes Testmodell für die Evaluierung der Sulfoxidfragmentierung. Nach erfolgreicher Synthese und Anwendung sollte schließlich Reagenz **64** synthetisiert werden das eine zusätzliche permanente Ladung trägt (Abbildung 41).

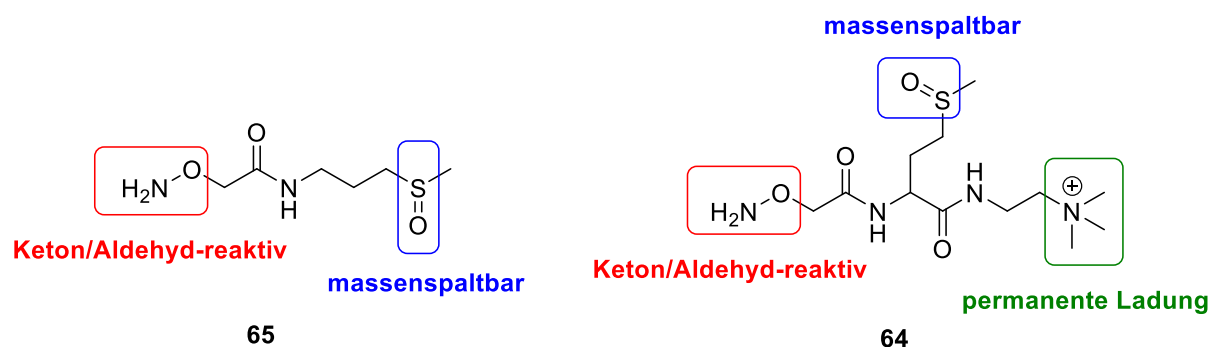
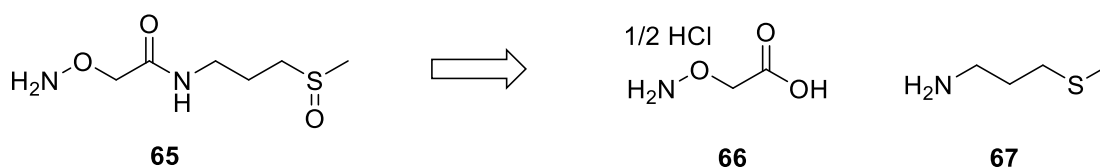


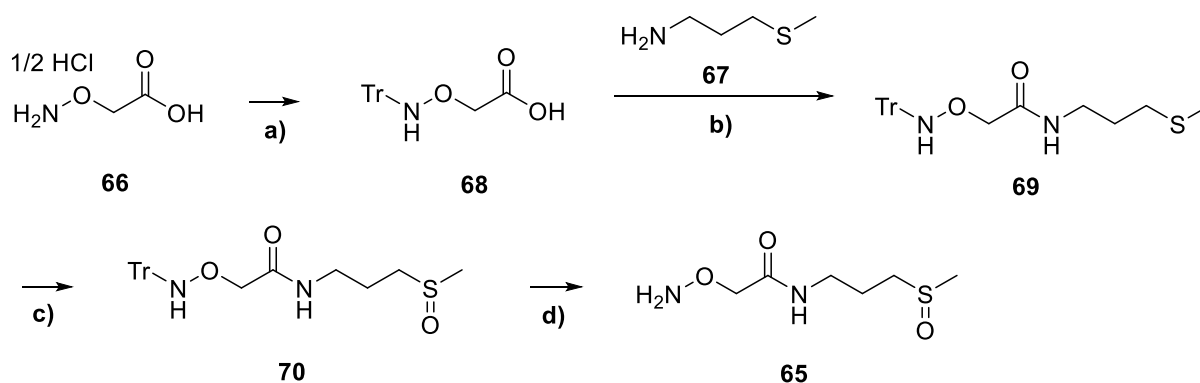
Abbildung 41 Entwurf der neuen Sulfoxid-basierten Derivatisierungsreagenzien **65** und **64**.

Das vereinfachte Testmolekül **65** ist aus Aminooxyessigsäure **66** und 3-(Methylthio)propylamin **67** leicht zugänglich (Schema 28).



Schema 28 Retrosynthese des Testmoleküls **65**. **65** kann einfach aus Aminooxyessigsäure **66** und 3-(Methylthio)propylamin **67** dargestellt werden.

Die Syntheseroute für **65** ist in Schema 29 dargestellt. Erster Schritt der Synthese war die Einführung einer *N*-Trityl-Schutzgruppe in Aminooxyessigsäure (**66**) nach einer Vorschrift von *Kojima et al.*^[108] Die *N*-Trityl-geschützte Säure **68** wurde in einer HBTU vermittelten Amidkupplungsreaktion mit 3-(Methylthio)propylamin (**67**) umgesetzt. Das Amid **69** konnte in einer guten Ausbeute von 87% erhalten werden. Die Oxidation des Amids **69** wurde mit *m*CPBA durchgeführt und lieferte Sulfoxid **70** in einer sehr guten Ausbeute von 92% und in sehr hoher Reinheit.

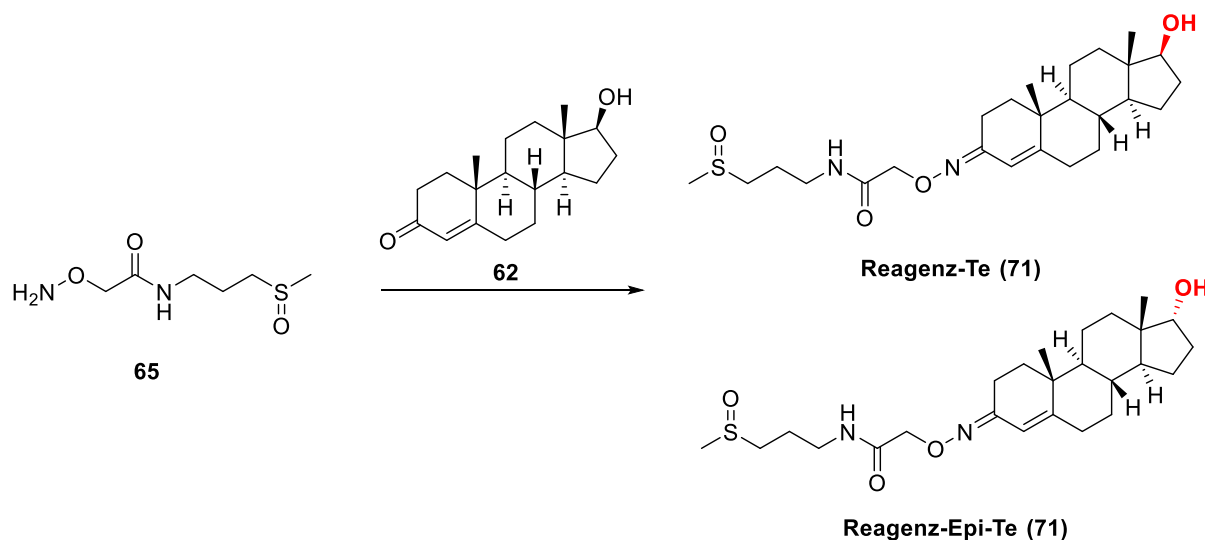


Schema 29 Syntheseroute zur Darstellung von **65**. a) TrCl (1.2 Äq), NEt₃ (2.0 Äq) in Pyridin, 24 h, RT, 74%^[108] b) HBTU (1.2 Äq), DIPEA (3.0 Äq) in DCM, 12 h, RT, 87% c) *m*CPBA (1.0 Äq), DCM/EtOH (10:1), 92% d) 2M HCl, H₂O, 12 h, RT, 94%.

Tabelle 2 Getestete Bedingungen zur Tritylentschützung von **70**.

Entschützung	Bedingungen	Ausbeute
2% TFA in DCM	RT, 10 min	72%
Et ₃ SiH (1.2 Äq), 2% TFA in DCM	RT, 12 h	nicht bestimmbar wegen Verunreinigung
2 M HCl _{aq} /DCM (1:1)	RT, 12 h, 40 °C, 2 h	94%

Für die Trityl-Entschützung von **70**, wurden drei verschiedene Bedingungen getestet (Tabelle 2). Die Entschützung mit 2% TFA in DCM, lieferte **65** in einer moderaten Ausbeute von 72%. Durch Verwendung des Carbokation-Scavenger Triethylsilan^[109], wurde eine Steigerung der Ausbeuten erhofft. Das entstehende EtSi₃⁺ CF₃CO₂⁻ Salz konnte jedoch schlecht von dem wasserlöslichen **65** abgetrennt werden. Durch Entschützung mit 2 M HCl in einem zwei Phasen-System aus H₂O und DCM konnte die höchste Reinheit erzielt werden. Das Tritylkation konnte durch mehrfaches Waschen der wässrigen Phase mit DCM entfernt werden. Das wasserlösliche Produkt wurde lyophilisiert und wurde in einer guten Ausbeute von 94% und hoher Reinheit erhalten. Auf diesem Weg konnte **65** in einer Gesamtausbeute von 56% über 4 Stufen hergestellt werden.



Schema 30 Umsetzung von Reagenz **65** mit Testosteron **62** zu Addukt **71**. 0.5% Ameisensäure in einem 1:1:1-Gemisch aus H₂O/MeOH/MeCN, 60 °C für 1 h, RT für 12

Zur Evaluierung der Fragmentierungseigenschaften, wurde Derivatisierungsreagenz **65** mit Testosteron zu Addukt **71** umgesetzt (Schema 30) und über HPLC aufgereinigt. Abbildung 42 zeigt die UV-Spur des HPLC-aufgereinigten Testosteron Adduktes **71**. Es wurde eine Mischung aus *Epi*-Testosteron-Addukt und Testosteron-Addukt erhalten, die per HPLC nicht aufgetrennt werden konnten. Für die massenspektrometrische Analyse spielt die Enantiomerenreinheit jedoch keine Rolle.

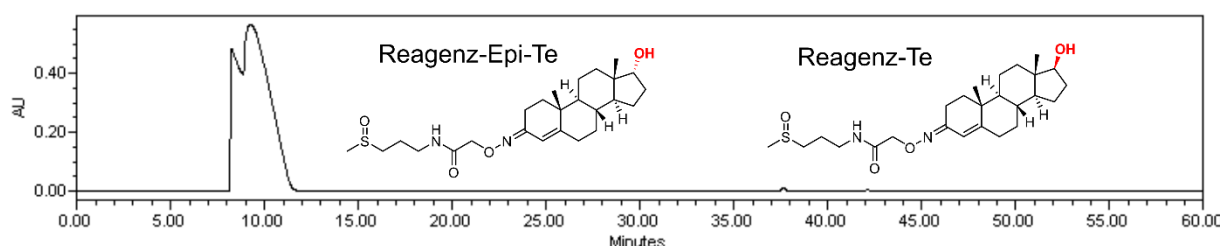
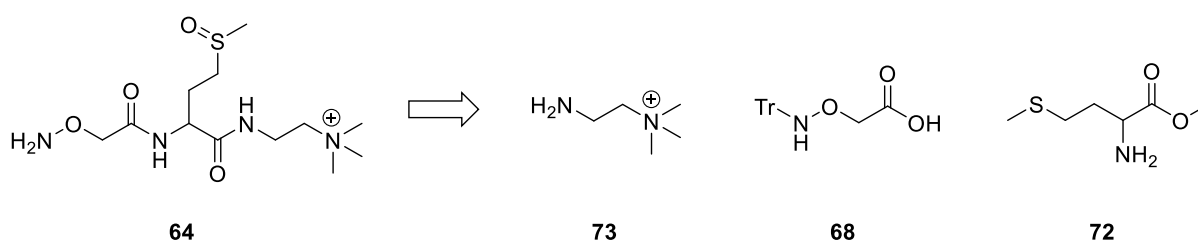


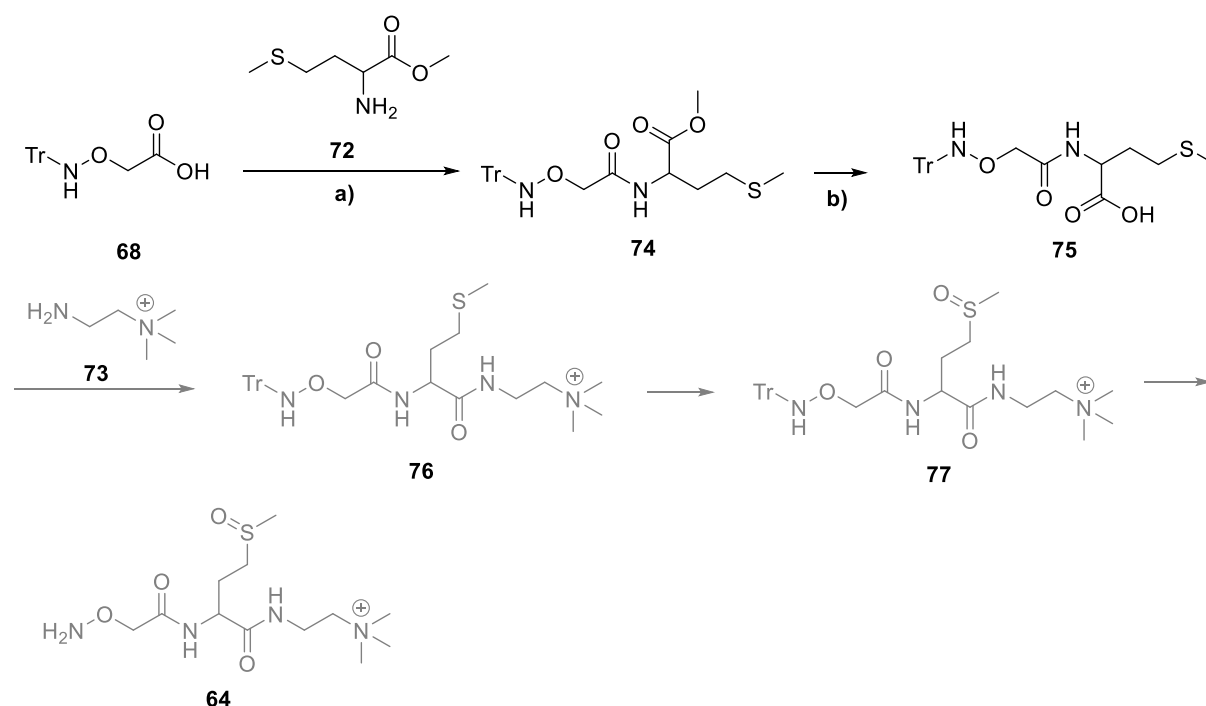
Abbildung 42 UV-Chromatogramm nach der HPLC-Aufreinigung von **71**. Der analytische Lauf wurde innerhalb 45 Minuten von 0% auf 70% Acetonitril in Wasser durchgeführt. Der Doppelpeak bei 10 min stellt das Enantiomerengemisch aus Epi-Testosteron- und Testosteron-Addukt dar.

Das HPLC aufgereinigte Addukt **71** wurde in Zusammenarbeit mit *Sarah Schiffrs* massenspektrometrisch untersucht. Nachdem das Testosteron-Addukt **71** bei niedriger Energie spaltete, wurde das Reagenz **64** mit zusätzlicher permanenter Ladung synthetisiert. Das Design von **64** vereint Massenspaltbarkeit, Sensitivitätssteigerung, optimale Reaktivität mit dem Keto-Analyten sowie eine gute Wasserlöslichkeit. **64** kann einfach aus *N*-Trityl-geschützter Aminoessigsäure **68**, dem Methylester von Methionin **72** und Amin **73** dargestellt werden (Schema 31).



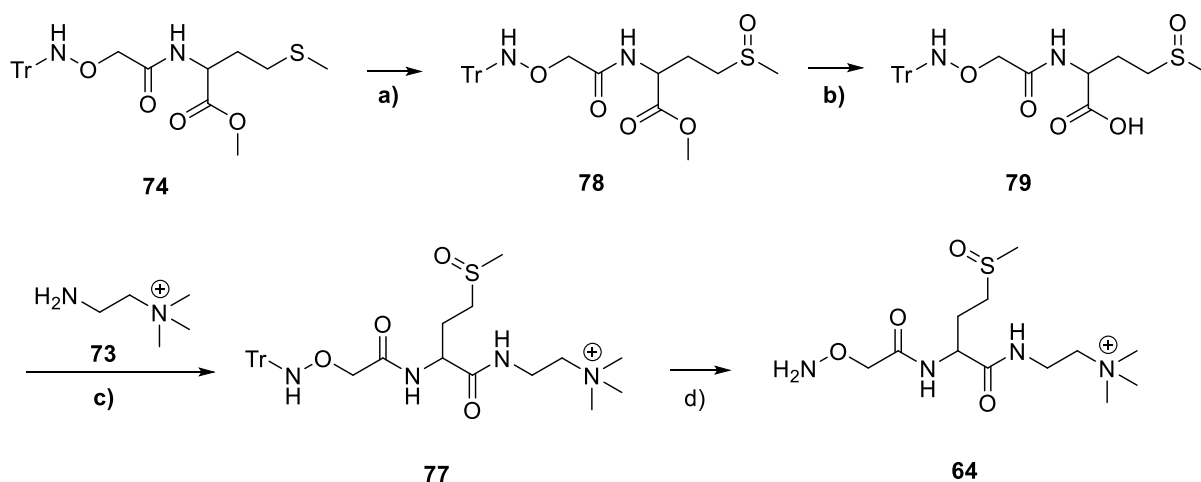
Schema 31 Retrosynthese von **64** ausgehen von Amin **73**, *N*-Trityl-geschützter Aminoessigsäure **68** und Methionin-Methylester **72**.

Ausgehend von der *N*-Trityl-geschützten Aminoessigsäure **68** und dem Methylester von Methionin **72**, konnte Amid **74** durch eine HBTU vermittelte Peptidkupplung einfach in einer Ausbeute von 84% dargestellt werden (Schema 32). Der Methylester des Amidierungsproduktes **74** wurde quantitativ mit LiOH gespalten. Zur Einführung der permanenten Ladung, wurde Säure **75** nach Aktivierung mit HBTU, mit dem Amin **73** umgesetzt. LC-MS Analyse des Rohproduktes zeigte die Entstehung des gewünschten Amidierungsproduktes **76**.



Schema 32 Getestete Strategie zur Darstellung von **64**. a) HBTU (1.2 Åq), DIPEA (3.0 Åq) in DCM, 12 h, RT, 84%, b) LiOH (3.0 Åq), THF/H₂O, *quant*.

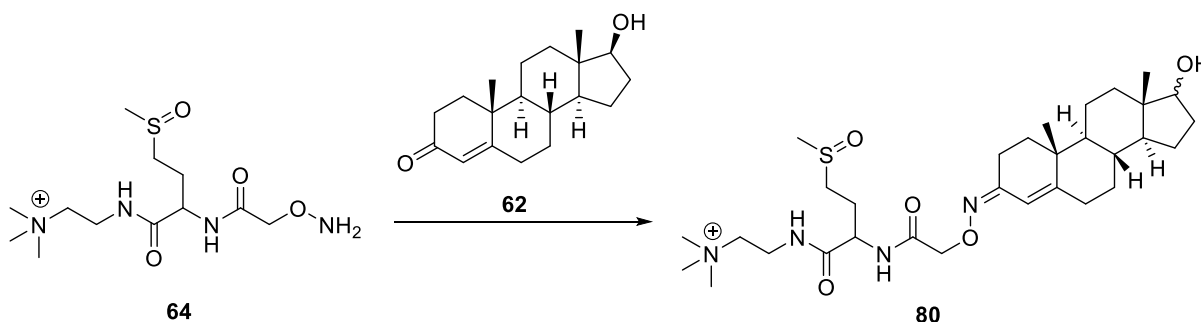
Eine Isolierung von **76** war über Normalphasen-Säulenchromatographie trotz Verwendung eines stark polaren Eluenten (DCM:MeOH: 9M NH₃:H₂O 9:1:0.6:0.6) nicht möglich. Auch eine Extraktion war nicht möglich. Da bereits geringe Mengen des Zielmoleküls **64** für massenspektrometrische Analysen ausreichen, wurde beschlossen das Rohprodukt weiter umzusetzen und am Ende der Synthese über HPLC aufzureinigen. Oxidation des Rohproduktes mit *m*CPBA, sowie anschließende Entschützung mit HCl, konnten das gewünschte Sulfoxid **77** darstellen. Ein intensives Signal bei $m/z = 565.29$ (berechnet: 565.28) im LC-MS Spektrum wies auf die Entstehung von **77** hin. Eine Isolierung von **77** mittels HPLC war jedoch nicht möglich. Da die Umsetzung mit Testosteron **62** zu einer besseren UV-Sichtbarkeit führt, wurde das Testosteron-Addukt **76** hergestellt (Schema 34). Doch auch nach Umsetzung mit **62** konnte kein **76** *via* HPLC isoliert werden. Als Hauptfraktion wurde freies Testosteron **62** isoliert. Dies deutete darauf hin, dass das Rohprodukt vor Umsetzung mit **62** kaum Reagenz **64** enthielt, obwohl **76** ein intensives Signal in der LC-MS zeigte. Die sehr gute Sichtbarkeit im Massenspektrometer schien jedoch vielversprechend für die Herabsetzung der Nachweisgrenze derivatisierter Analyten. Da die permanente Ladung eine Aufreinigung erschwerte, wurde die Synthesestrategie so geändert, dass der Einbau der permanenten Ladung zu einem späteren Zeitpunkt der Synthese erfolgt (Schema 33).



Schema 33 Darstellung von **64** ausgehend von Amid **74**. a) *m*CPBA (1.0 Äq), DCM/EtOH (10:1), 91%; b) LiOH, THF/H₂O (4:1), quant.; c) HBTU (1.2 Äq), DIPEA (3.0 Äq), in DCM, 12 h, RT, 42%; d) 2M HCl(aq), H₂O, 12 h, RT, 76%.

Die Oxidation von Amid **74** lieferte Sulfoxid **76** in sehr guter Ausbeute von 91% und in hoher Reinheit. Nach der quantitativen Verseifung mit LiOH zu **79** erfolgte die HBTU-vermittelte Einführung der permanenten Ladung mit Amin **73**. Amidierungsprodukt **77** konnte schließlich über Umkehrphasen-Chromatographie (C₁₈-Silica, 80/20 Wasser/MeCN) in einer Ausbeute von 76% isoliert werden. Die Tritylschutzung erfolgte mit 2M HCl(aq) und DCM. Das Wasser wurde durch Lyophilisation entfernt. Auf diesem Weg konnte Reagenz **64**, mit einer permanent geladenen Trimethylamin-Gruppe, ausgehend von *N*-Tritylgeschützter Aminoessigsäure **68** und Methionin-Methylester **72** in einer Gesamtausbeute von 18% über 6 Schritte in hoher Reinheit dargestellt werden.

Für die massenspektrometrische Evaluierung wurde der Analyt Testosteron **62** mit dem neuen Sulfoxid-basierten Reagenz **64** zu einem Testosteron-Addukt **76** umgesetzt (Schema 34) und *via* HPLC aufgereinigt. Es wurde wie bei dem Testosteron-Addukt mit **65** ein Gemisch aus *Epi*-Testosteron-Addukt und Testosteron-Addukt erhalten.



Schema 34 Darstellung des Testosteron-Adduktes **64** durch Umsetzung von Testosteron **62** mit den Sulfoxid-Reagenz **64** in 0.5% Ameisensäure in einem 1:1:1-Gemisch aus H₂O/MeOH/MeCN, bei 60 °C für 1 h, RT für 12 h. Die HPLC Aufreinigung wurde mit einem Gradienten von 0% auf 70% Acetonitril in Wasser durchgeführt.

Die Testosteron-Addukte der kommerziell erhältlichen Reagenzien *Amplifex*® **60** und *Girard T* **59**, sowie des Reagenzes **61**, zur Detektion abasischer Stellen im Genom, wurden von *Rene*

Rahimoff hergestellt. Mit den Testosteron-Addukten erfolgte schließlich in Zusammenarbeit mit *Sarah Schiffers* und *Michael Stadlmeier* die massenspektrometrische Analyse zur Evaluierung der Fragmentierungseigenschaften der Addukte (3.3.3) sowie des sensitivitätssteigernden Effektes im Hinblick auf Testosteron **62** (3.3.2).

3.3.2 Bestimmung der Nachweisgrenze verschiedener Testosteron-Addukte

Für die Bestimmung der LOD-Werte wurden je 5 – 20 mg der HPLC-aufgereinigten Addukte abgewogen und eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Diese Verdünnungsreihe wurde von *Sarah Schiffers* an einem *Agilent* Triple Quadrupol LC-MS Gerät bis zur Nachweisgrenze gemessen. Die letzte messbare Konzentration stellt die Nachweisgrenze (LOD, *limit of detection*) dar. Das Signal ist signifikant wenn das Integral der Peakfläche dreimal größer ist als der S/N-Hintergrund und ergibt somit den LOD-Wert. Abbildung 43 zeigt die verschiedenen gemessenen Testosteron-Addukte im Vergleich.

Den niedrigsten LOD-Wert hatte das kommerziell erhältliche *Amplifex*®-Reagenz **60** mit einem LOD von 5 – 10 amol,^[66] gefolgt von dem *Carell*-Reagenz **61** mit einem LOD von 20 – 30 amol. Das neue Sulfoxid-basierte Reagenz **64** wies einen LOD von 30 – 40 amol auf und erreichte somit fast den LOD von **61**. Das *Girard T* Reagenz **59** war mit einem LOD von 60 – 70 amol am schlechtesten sichtbar. Um den Effekt der Sensitivitätssteigerung beurteilen zu können, wurde auch der LOD des underivatisierten Testosterons **62** bestimmt. **62** war bis zu einer Konzentration von etwa 80 – 100 amol sichtbar. Somit führt die Derivatisierung von Testosteron **62** mit dem *Amplifex*®-Reagenz **60** zu einer Verstärkung von Faktor 20, mit dem *Carell*-Reagenz **61** um Faktor 5, mit dem neuen Sulfoxid-Reagenz **64** um Faktor 3.3 und mit *Girard T* **59** nur um Faktor 1.7. Den Messungen zufolge stellt das neue Sulfoxid-basierte Reagenz **64** somit keine wesentliche Verbesserung zum *Carell*-Reagenz **61** dar. Beide Reagenzien **61** und **64** erreichten in unseren ersten Studien den LOD des kommerziell erhältlichen *Amplifex*® Reagenz **60** nicht ganz.

Steroide mit 3-oxo-4-ene-Struktur, wie Testosteron **62** und Progesteron, zeigen eine relativ gute Signalantwort im positiven ESI-MS Modus, da sie basischer sind als die meisten neutralen Steroide. Die Ladung der protonierten Form kann im A-Ring delokalisiert werden. Bei der Fragmentierung im MS/MS-Experiment werden charakteristische Produktionen ($m/z = 100.2$ und 109.0) gebildet.^[69, 110] Um den Effekt der Signalverstärkung durch Derivatisierung mit den verschiedenen Reagenzien besser untersuchen zu können, wären andere Analyten mit geringerer Protonenaffinität geeigneter, wie 5-ene-Steroide oder Estrogen.

Neben den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Analyten und der Addukte, kann der LOD auch durch Optimierung der LC-MS/MS Methode verbessert werden. So haben die Eigenschaften der Flüssigphase, wie pH-Wert, Organik-Anteil oder Salzanteile, großen Einfluss auf die Ionisierung des Analyten und somit die Sensitivität der Methode. In unseren

Messungen konnte wir zeigen, dass der Wechsel von MeOH zu Acetonitril die LOD-Werte deutlich herabsetzt. Dieser Effekt wurde auch bereits in anderen massenspektrometrischen Studien nachgewiesen.^[111]

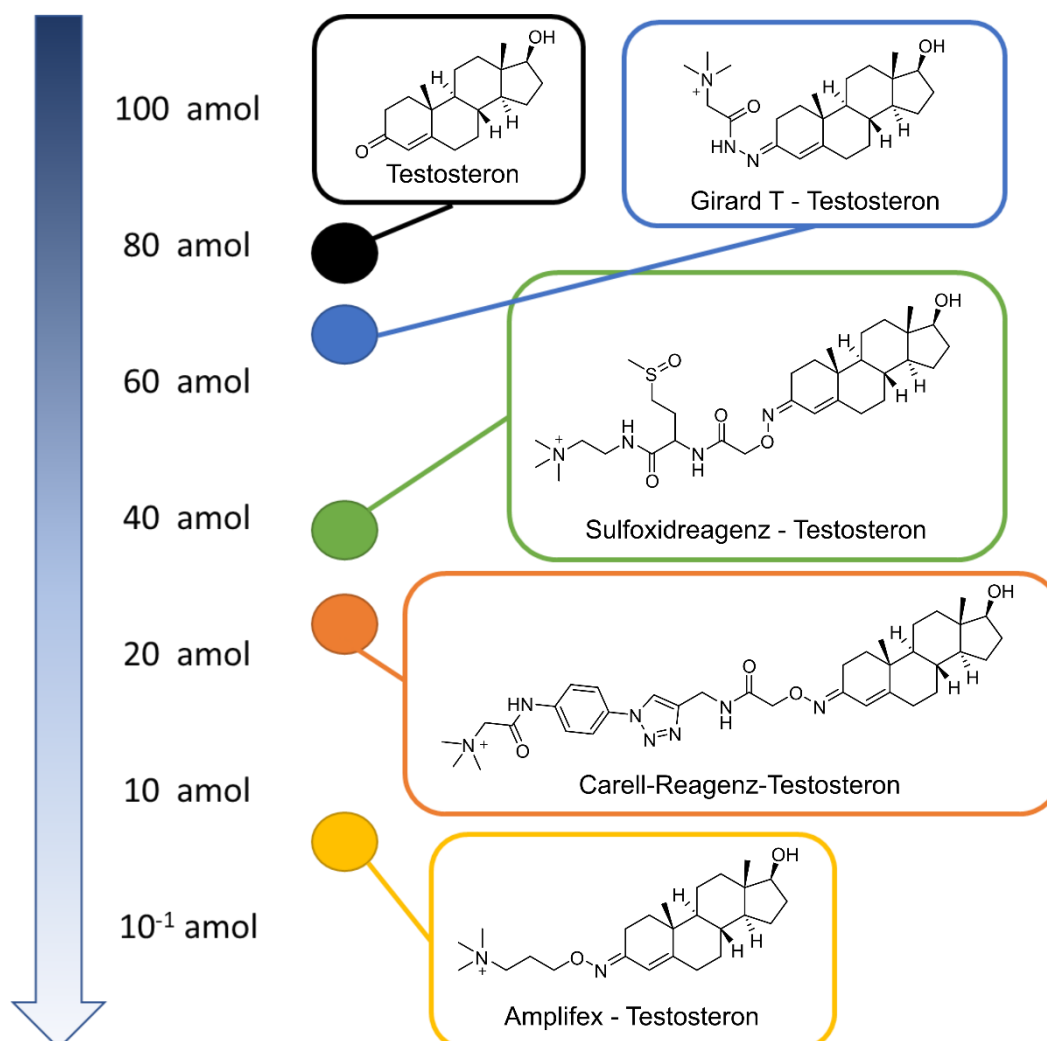


Abbildung 43 Vergleich der Nachweisgrenzen von Testosteron-Addukten bezüglich der LOD-Werte (*limit of detection*).

Nachdem die HPLC aufgereinigten Testosteron-Addukte in reiner Form gemessen wurden, können keine Aussagen über die Anwendung in biologischen Flüssigkeiten, wie Blutserum, getroffen werden. In diesen Proben spielt auch die Löslichkeit und die Vollständigkeit der Derivatisierung eine entscheidende Rolle. Daher müssen die Reagenzien noch hinsichtlich ihrer Löslichkeit und Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Testosteron in einer komplexen Matrix untersucht werden.

3.3.3 Evaluierung der Fragmentierungseigenschaften verschiedener Testosteron-Addukte

Die Sensitivität der Methode ist von der Selektivität der Fragmentierung sowie der Spaltungseffizienz abhängig. Um die Fragmentierungseigenschaften der verschiedenen Testosteron-Addukte zu vergleichen, wurden diese in Zusammenarbeit mit *Michael Stadlmeier*

an einem *Orbitrap* LC-MS-Massenspektrometer untersucht. Hierfür wurden die verschiedenen Testosteron-Addukte der Reagenzien **59**, **60**, und **61** (aus Abbildung 43) sowie der neuen Sulfoxid-Reagenzien **64** und **65** in der Ionenfalle ionisiert und anschließend bei verschiedenen Energien fragmentiert. Die Fragmentierung wurde jeweils bei verschiedenen HCD (normalisierte HCD = 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60) sowie CID-Energien (CID = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40) an einem *Orbitrap* LC/MS-Gerät gemessen. CID ist ein resonanzbasierter Prozess und wird in einer Ionenfalle durchgeführt. HCD ist ein nicht-resonanzbasierter Prozess außerhalb der Ionenfalle das zu einem anderen Fragmentierungsmuster führt.

- HCD → nicht-resonanzbasierter Prozess in der HCD-Zelle
- CID → resonanzbasiert in der linearen Ionenfalle

Mit dem *Orbitrap* Gerät kann man sowohl eine CID-Fragmentierung als auch eine HCD-Fragmentierung durchführen, da es sowohl eine Kollisionszelle als auch eine Ionenfalle besitzt. In der QExactive wird eine HCD-Fragmentierung in der HCD-Zelle durchgeführt. Die Fragmentierung im *Triple Quadrupol* (QQQ) Massenspektrometer erfolgt in Quadrupol (Q2) und ist daher kein CID-Prozess sondern ein HCD-Prozess. Allerdings sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass man die Fragmentierungsprozesse in verschiedenen Geräten nicht eindeutig miteinander vergleichen kann.

Im durchgeführten MS²-Experiment, wurde jeweils das Mutterion isoliert und mit der jeweiligen CID oder HCD Energie fragmentiert. Die abgebildeten MS²-Spektren zeigen somit nur die Fragmentionen die bei Spaltung des Vorläuferions entstehen. In den Abschnitten 3.3.3.1 bis 3.3.3.4 werden die Fragmentierungseigenschaften der einzelnen Addukte im CID und HCD-Prozess beschrieben. Anschließend erfolgt eine Diskussion der Spaltungseigenschaften der Addukte im Vergleich.

3.3.3.1 Fragmentierung des Testosteron Adduktes des *Amplifex*®-Reagenz **60**

Zunächst wird die Fragmentierung des *Amplifex*®-Reagenz Adduktes **60** untersucht. Zunächst wird auf die CID-Spaltung und anschließend auf die HCD-Fragmentierung eingegangen.

Ergebnisteil

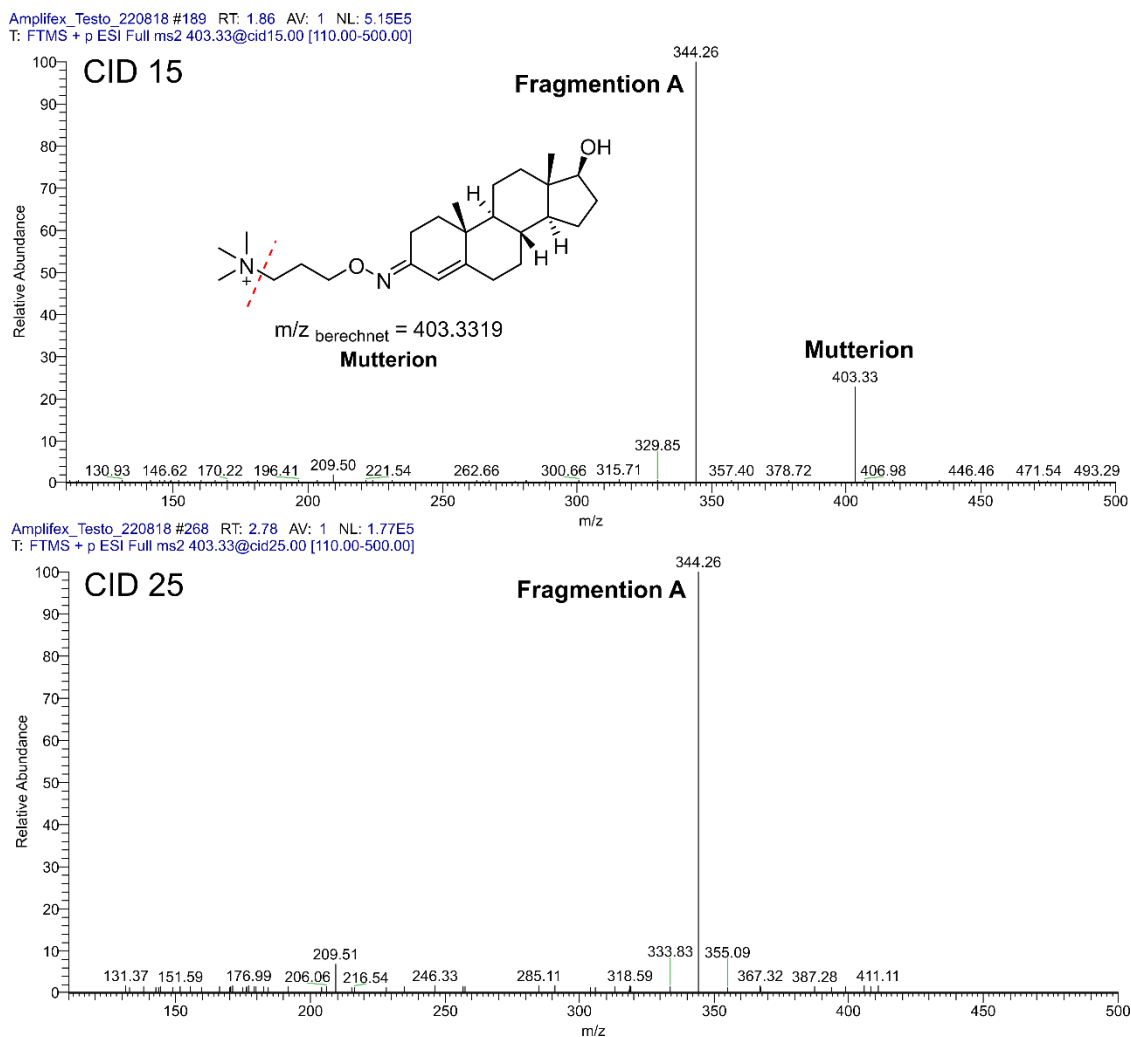


Abbildung 44 MS²-Spektren der CID-induzierten Spaltung des Testosteron-Adduktes des *Amplifex*®-Reagenzes **60**. Das obere Spektrum wurde bei CID 15 aufgenommen, das untere bei einer CID-Energie von 25.

Bei einer CID von 15% ist das Produkt-Ion mit $m/z = 344.26$ bereits deutlich intensiver als das Mutter-Ion ($m/z = 403.33$) und bei einer CID von 25% ist das Mutterion vollständig gespalten. Abbildung 44 zeigt die MS²-Spektren der CID-induzierten Spaltung des Adduktes bei CID 15 und 25% im Vergleich. Die Fragmentierung verläuft selektiv und liefert nur ein intensives Produkt mit $m/z = 344.26$, welches dem Verlust der Trimethylamin-Gruppe zugeordnet werden kann.

Auch die HCD-Fragmentierung des *Amplifex*®-Reagenz **60** Adduktes verläuft selektiv unter Entstehung eines intensiven Produkts mit $m/z = 344.26$ (Abbildung 45). Das Mutterion ist bei einer HCD von 30 vollständig gespalten. Auch bei höheren HCD-Energien werden keine unspezifischen Fragmente gebildet.

Ergebnisteil

Amplifex_Testo_220818 #342 RT: 3.65 AV: 1 NL: 1.00E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 403.33@hcd35.00 [110.00-500.00]

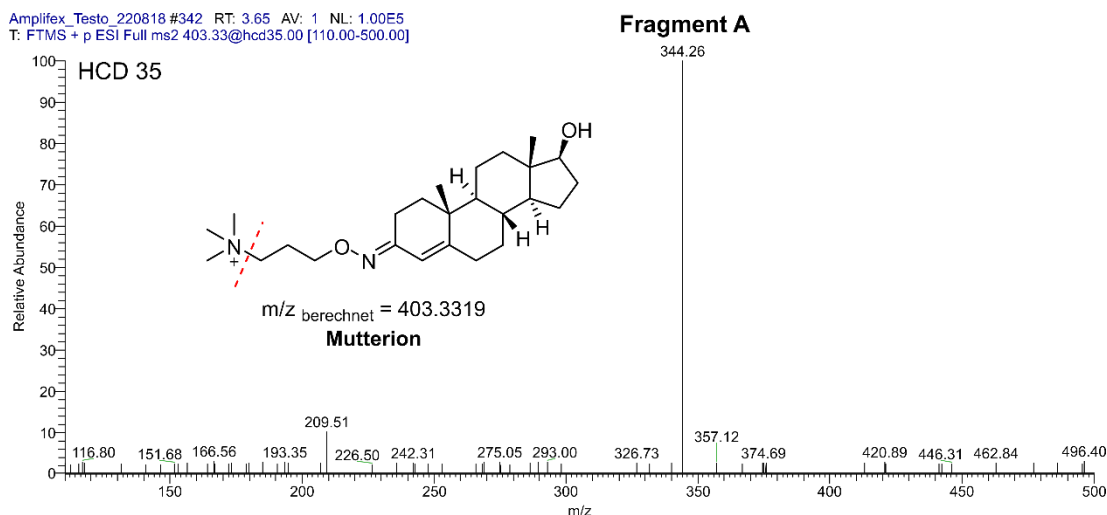
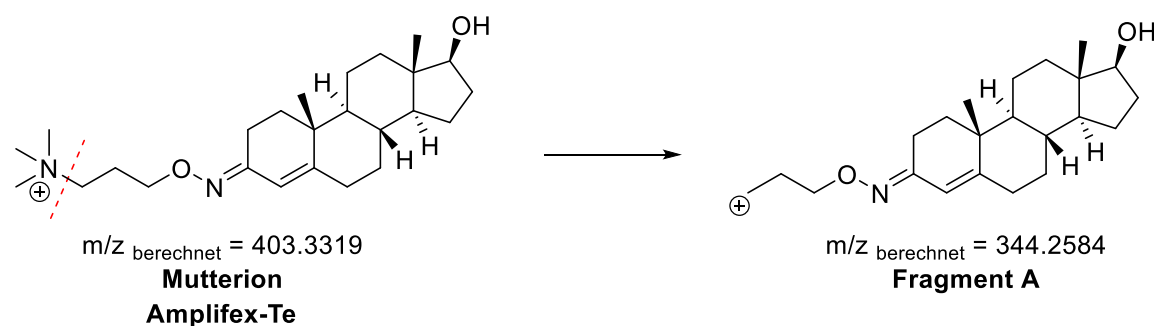


Abbildung 45 Die HCD-Fragmentierung von *Amplifex*® bei einer normalisierten HCD von 35 liefert ein intensives Produktion mit $m/z = 344.2$.

Schema 35 zeigt die selektive Spaltung des Mutterions ($m/z = 403.33$) zum Produktion ($m/z = 344.26$), welches durch Abspaltung der Trimethylamin-Gruppe gebildet wird.



Schema 35 Die selektive Spaltung des Testosteron-Adduktes vom *Amplifex*®-Reagenz **60** ($m/z = 403.33$) führt zur Entstehung von Fragment A ($m/z = 344.26$).

3.3.3.2 Fragmentierung des *Carell*-Reagenz Testosteron Adduktes **61**

Im folgenden Abschnitt wird auf die Fragmentierung des *Carell*-Reagenz **61** Testosteron-Adduktes eingegangen. Es wurden signifikante Unterschiede in der Selektivität der CID-induzierten Spaltung im Vergleich zur HCD-Fragmentierung gefunden. Abbildung 46 zeigt das MS²-Spektrum der CID-induzierten Spaltung von **61**-Te bei einer CID von 25%. Bei dieser Energie ist das Mutterion ($m/z = 632.39$) vollständig gespalten und es wird selektiv ein intensives Produktion mit $m/z = 604.39$ (Fragment A) gebildet. Dieses Produktion wird durch Abspaltung von Stickstoff aus dem Triazolring gebildet.

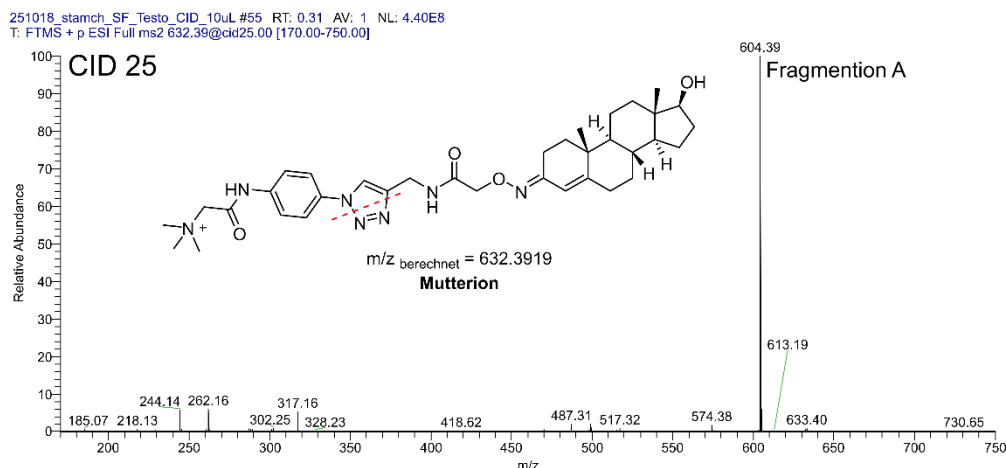


Abbildung 46 MS²-Spektrum des Testosteron-Adduktes von **61** bei einer CID-Energie von 25%.

Im Gegensatz zur spezifischen CID-Fragmentierung von **61**-Te, werden im HCD-Prozess viele unspezifische Fragmente gebildet. Bereits bei einer normalisierten HCD von 25 sind viele unspezifische Fragmentationen im niedrigen m/z -Bereich erkennbar. Wobei an dieser Stelle erwähnt werden sollte, dass im CID ein höherer *cut-off* bei geringen m/z -Werten erfolgt. Bei einer höheren HCD von 35 nimmt die Anzahl unspezifischer Ionen zu. Abbildung 47 zeigt MS²-Spektren der HCD-Messungen von **61**-Te bei den HCD-Energien 25 und 35 im Vergleich. Bei einer HCD von 30 bis 35 ist das Mutterion vollständig gespalten. Interessanterweise ist das Fragmentation von $m/z = 604.39$, welches durch Stickstoffverlust entsteht, nicht das intensivste Produkt im MS²-Spektrum. Zwei unspezifische Fragmentationen mit $m/z = 262.16$ und $m/z = 244.12$ sind deutlich intensiver als das Signal bei $m/z = 604.39$ (Tabelle 3).

Tabelle 3 Mögliche Summenformeln der beiden unspezifischen Fragmentationen $m/z = 244.14$ und 262.16 bei der HCD-Fragmentierung des Testosteron-Adduktes von **61**, sortiert nach Größe der Abweichung.

$m/z = 244.1443$		$m/z = 262.1551$	
Berechnete Summenformel	Delta ppm	Berechnete Summenformel	Delta ppm
C ₁₂ H ₁₆ N ₆	2.685	C ₁₄ H ₂₀ O ₂ N ₃	-1.723
C ₁₄ H ₁₈ ON ₃	-2.814	C ₁₂ H ₁₈ ON ₆	3.398
C ₉ H ₁₈ O ₃ N ₅	8.163	C ₉ H ₂₀ O ₄ N ₅	13.622

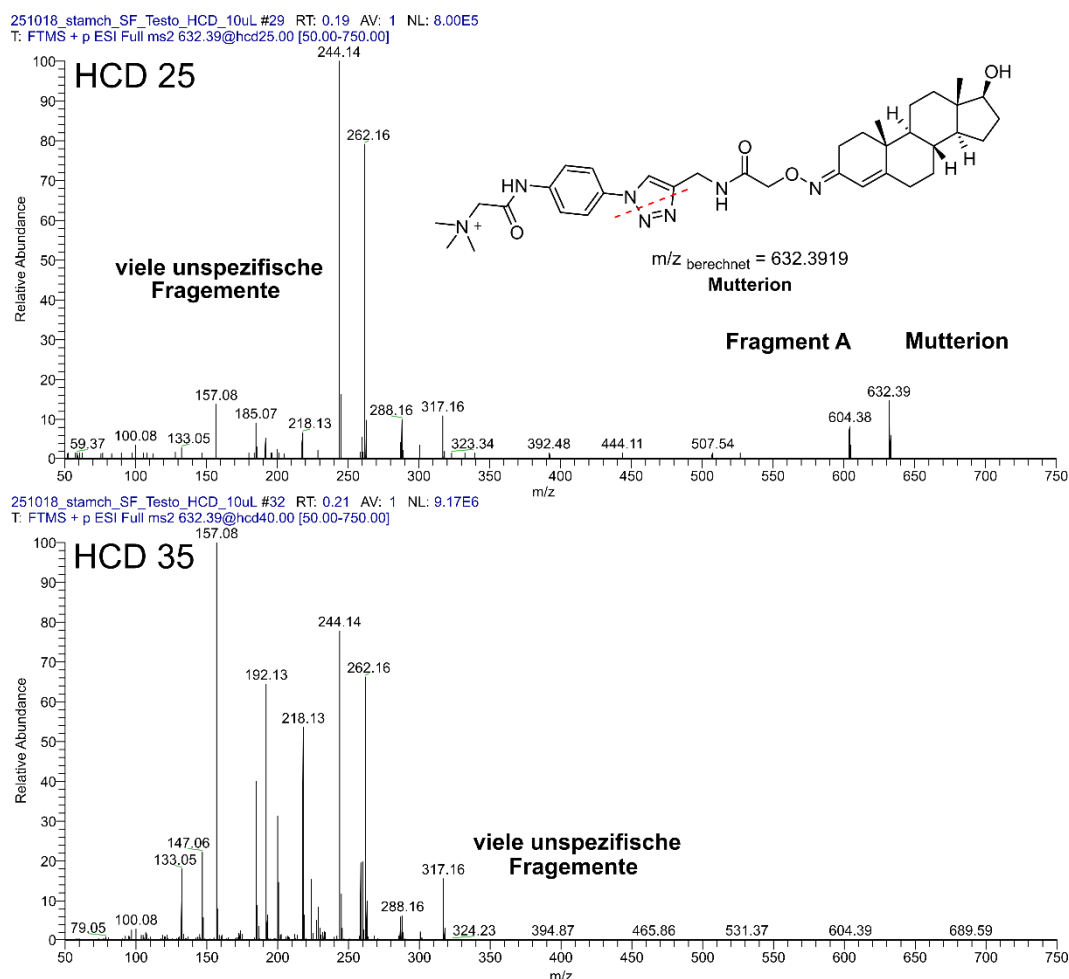
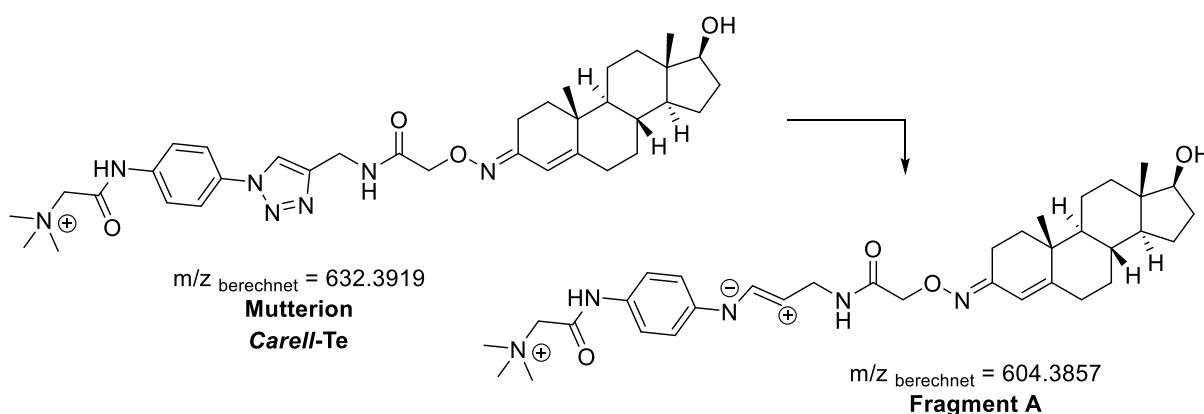


Abbildung 47 MS²-Spektren von **61**-Te bei HCD 25 und 35 im Vergleich. Bei der HCD-Fragmentierung von **61**-Te, entstehen viele unspezifische Fragmente.

Schema 36 zeigt die Stickstoffabspaltung des Testosteron-Adduktes von Reagenz **61** das zur Entstehung des Produktes mit $m/z = 604.39$ führt.



Schema 36 Fragmentierung des Testosteron Adduktes von Reagenz **61**.

3.3.3.3 Fragmentierung des *Girard T* Reagenz **59** Testosteron Adduktes

Das Testosteron Addukt des kommerziell erhältlichen *Girard T* Reagenzes **59** zeigt ebenfalls unterschiedliche Fragmentierungseigenschaften im HCD-Prozess gegenüber dem CID-Prozess. Es wird zunächst auf die CID-Spaltung eingegangen und anschließend die

HCD-Fragmentierung analysiert. Die CID-induzierte Spaltung verläuft spezifisch unter Entstehung eines Haupt-Produktions mit $m/z = 343.24$ (Fragmentation A), was der Abspaltung der Trimethylamin-Gruppe zugeordnet werden kann. Neben dem intensiven Produktion mit $m/z = 343.24$ ist ein schwaches Signal bei $m/z = 315.24$ erkennbar (Strukturformel Fragmentation B, siehe Schema 37). Bei einer CID von 30 ist das Mutterion vollständig gespalten.

GirardT_fragScreen_CID_20pmol #36 RT: 0.22 AV: 1 NL: 4.33E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 402.31@cid30.00 [110.00-750.00]

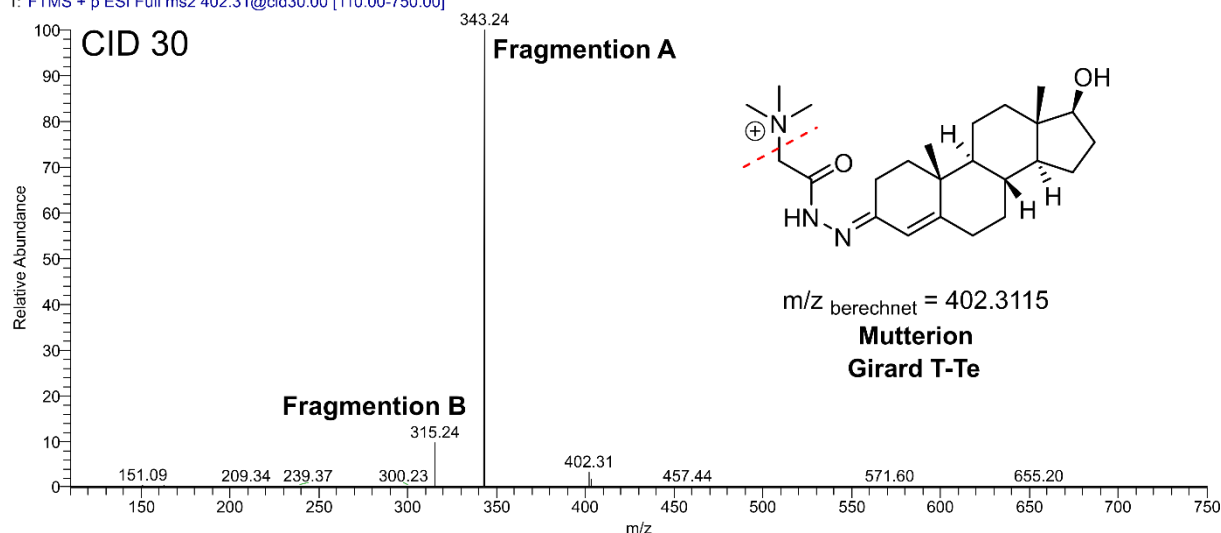
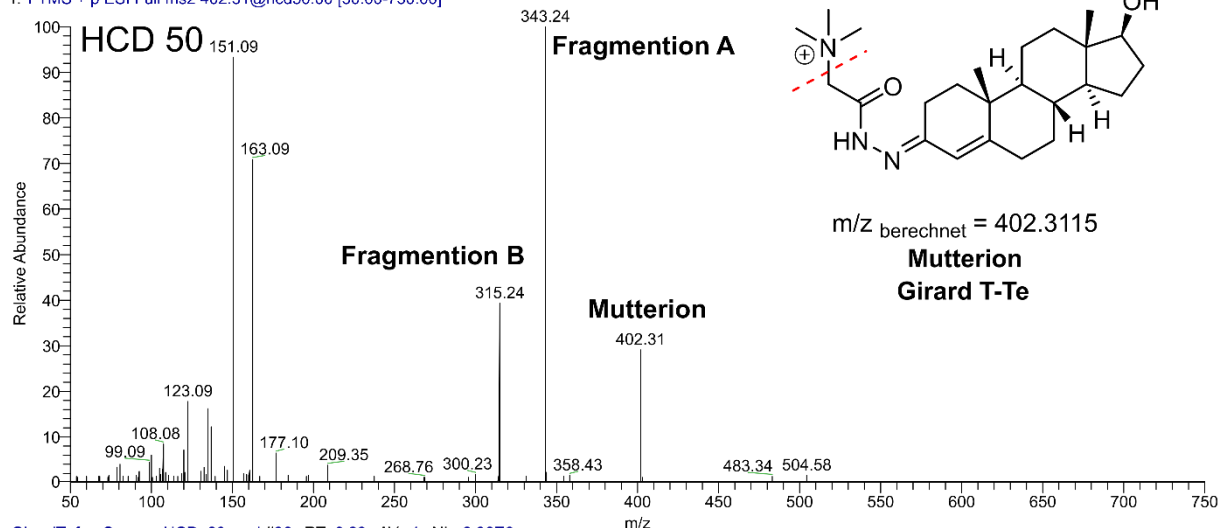


Abbildung 48 MS²-Spektrum der CID-Fragmentierung des Testosteron-Adduktes von **59** bei einer CID von 30%.

Im Gegensatz zur spezifischen CID-Spaltung, entstehen bei der HCD-induzierten Spaltung von **59** eine Vielzahl unspezifischer Fragmente. Das intensivste Ion ist wie beim CID-Prozess das Fragmentation A mit $m/z = 343.24$, das durch Abspaltung der Trimethylamin-Gruppe entsteht. Auch das Fragmentation B, mit $m/z = 315.24$, ist als intensives Signal erkennbar. Die Spaltung beginnt erst bei einer HCD von 45. Bei einer HCD von 60 ist das Mutterion vollständig gespalten.

Ergebnisteil

GirardT_fragScreen_HCD_20pmol #34 RT: 0.22 AV: 1 NL: 8.14E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 402.31@hcd50.00 [50.00-750.00]



GirardT_fragScreen_HCD_20pmol #36 RT: 0.23 AV: 1 NL: 2.86E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 402.31@hcd60.00 [50.00-750.00]

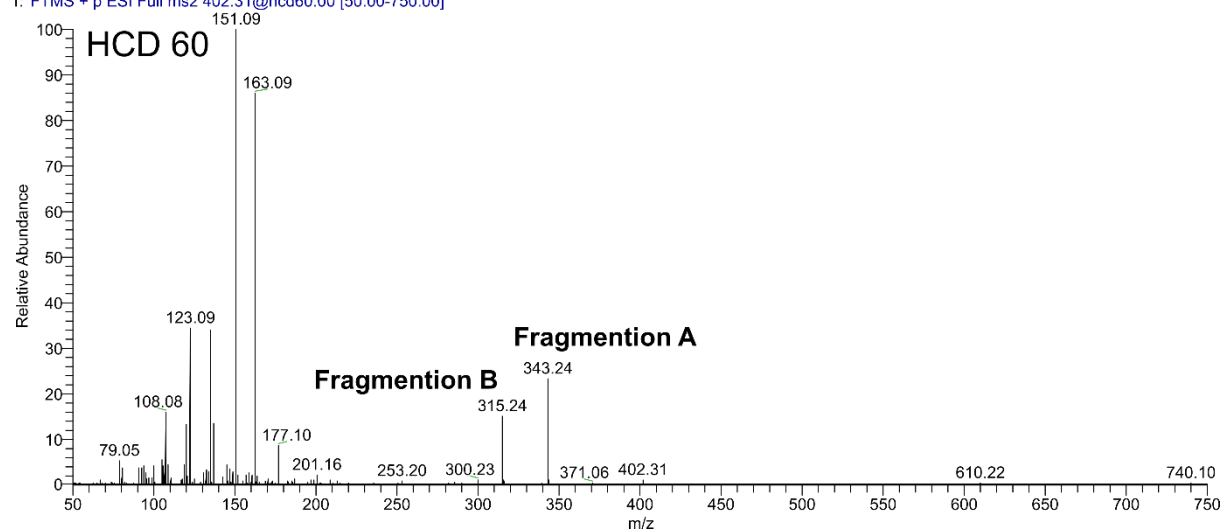
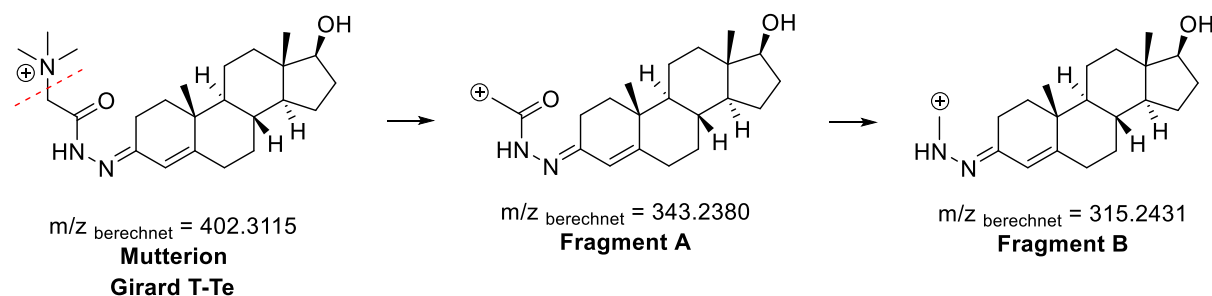


Abbildung 49 MS²-Spektren der HCD-Fragmentierung von **59**-Te.

Schema 37 zeigt die Fragmentationen die bei der Spaltung von **59**-Te im MS²-Spektrum gefunden wurden.



Schema 37 Fragmentierung des Testosteron Adduktes von *Girard T 59*.

3.3.3.4 Fragmentierung der Testosteron Addukte der Sulfoxid-basierten Reagenzien **64** und **65**

Im folgenden Abschnitt wird auf die Fragmentierung der Testosteron Addukte der neuen Sulfoxid-Reagenzien **64** und **65** eingegangen. Sowohl im CID- als auch im HCD-Prozess

Ergebnisteil

werden mehrere Produktionen gebildet. Abbildung 50 zeigt MS²-Spektren der Testosteron-Addukte der neuen Sulfoxid-basierten Reagenzien **64** und **65** bei einer CID von 30 und 25%. Beide Addukte bilden mehrere intensive Produktionen aus. Bei der Spaltung von **64** werden vier intensive Produktionen gebildet mit m/z = 534.30 (A), 529.37 (B), 570.30 (C) und 288.23 (D). Bei der Spaltung von **65** entstehen spezifische Produktionen mit m/z = 401.28 (A), 344.22 (B) und 288.23 (C). Die Mutterionen beider Addukte sind bei einer CID von 30 vollständig gespalten.

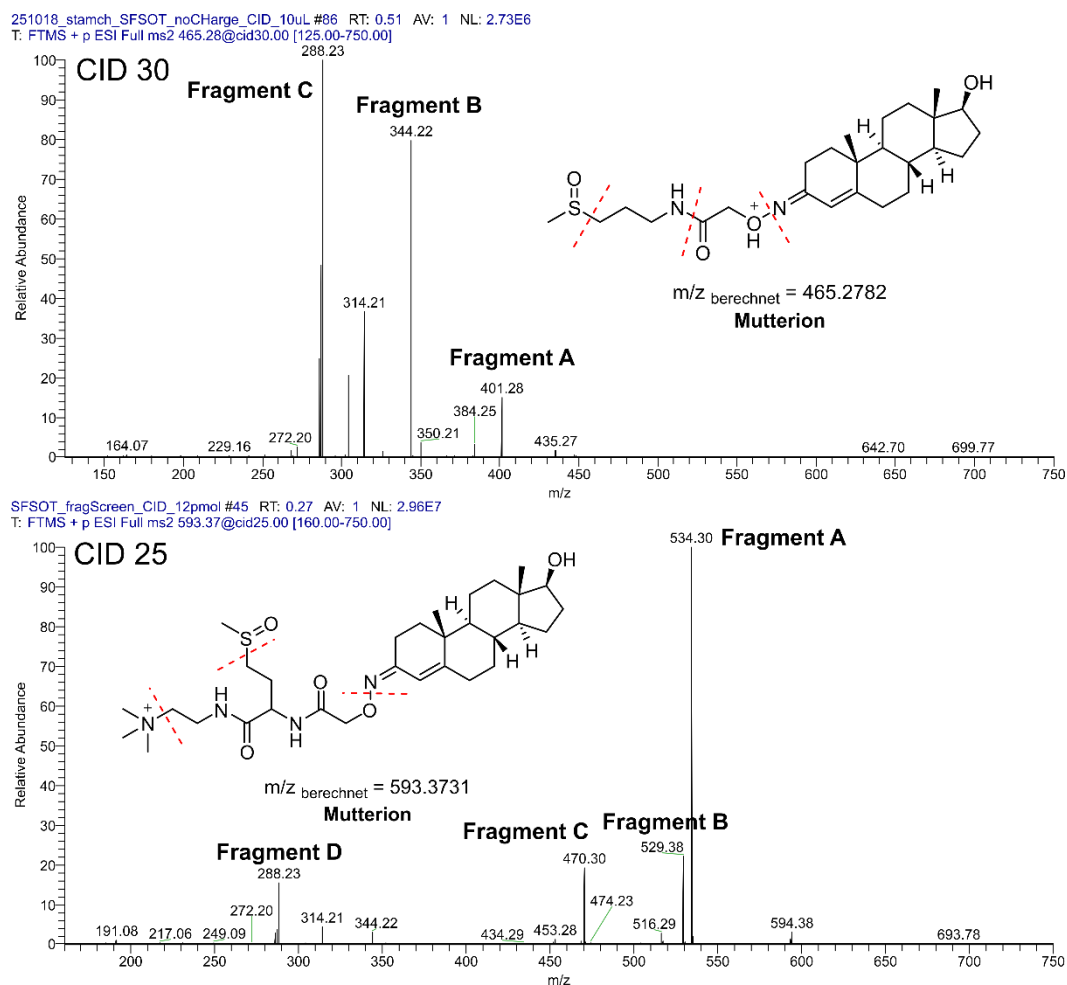


Abbildung 50 MS²-Spektren der CID-induzierten Fragmentierung der Sulfoxid-basierten Testosteron Addukte **64** und **65**. Bei einer CID von 30 sind die Mutterionen komplett gespalten. Die Spaltung erfolgt unspezifisch unter Entstehung mehrerer Produktionen (siehe Schema 38).

Auch im HCD-Experiment fragmentieren die Testosteron-Addukte der neuen Sulfoxid-basierten Reagenz **64** und **65** stark. Das Spektrum aus Abbildung 51 wurde bei einer HCD von 35 aufgenommen, Abbildung 52 bei einer HCD von 30. Die intensiven Produktionen entsprechen den Produktionen der CID-Fragmentierung.

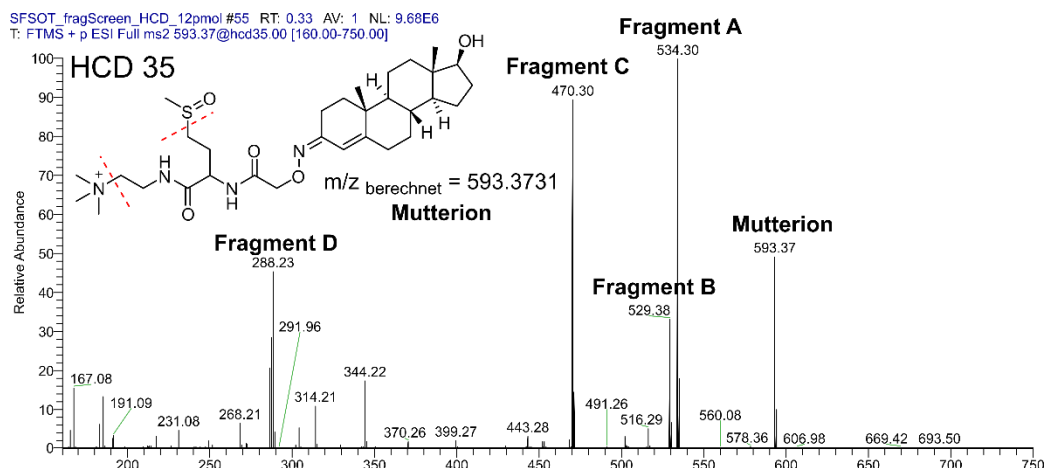


Abbildung 51 MS²-Spektrum des Testosteron-Adduktes der HCD-Fragmentierung des neuen Sulfoxid-basierten Reagenzes **65**.

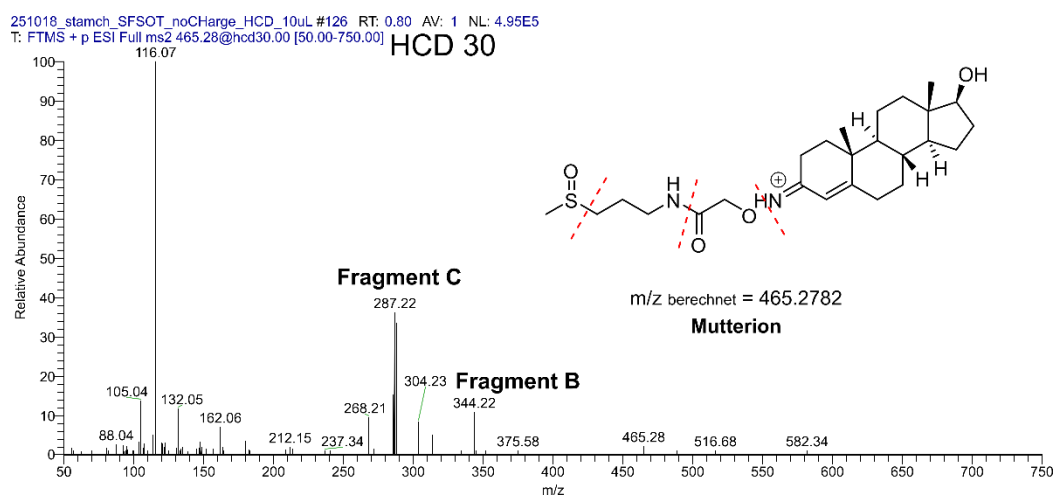
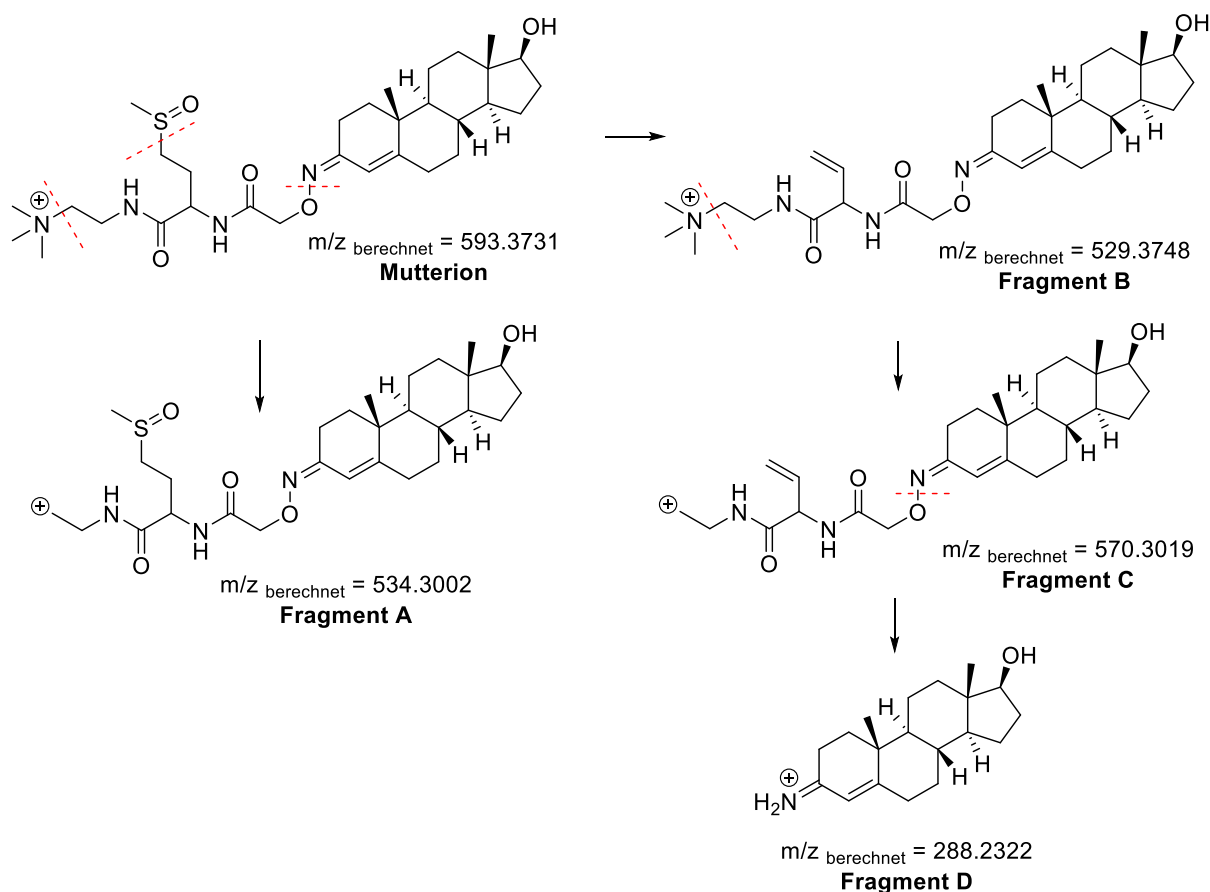
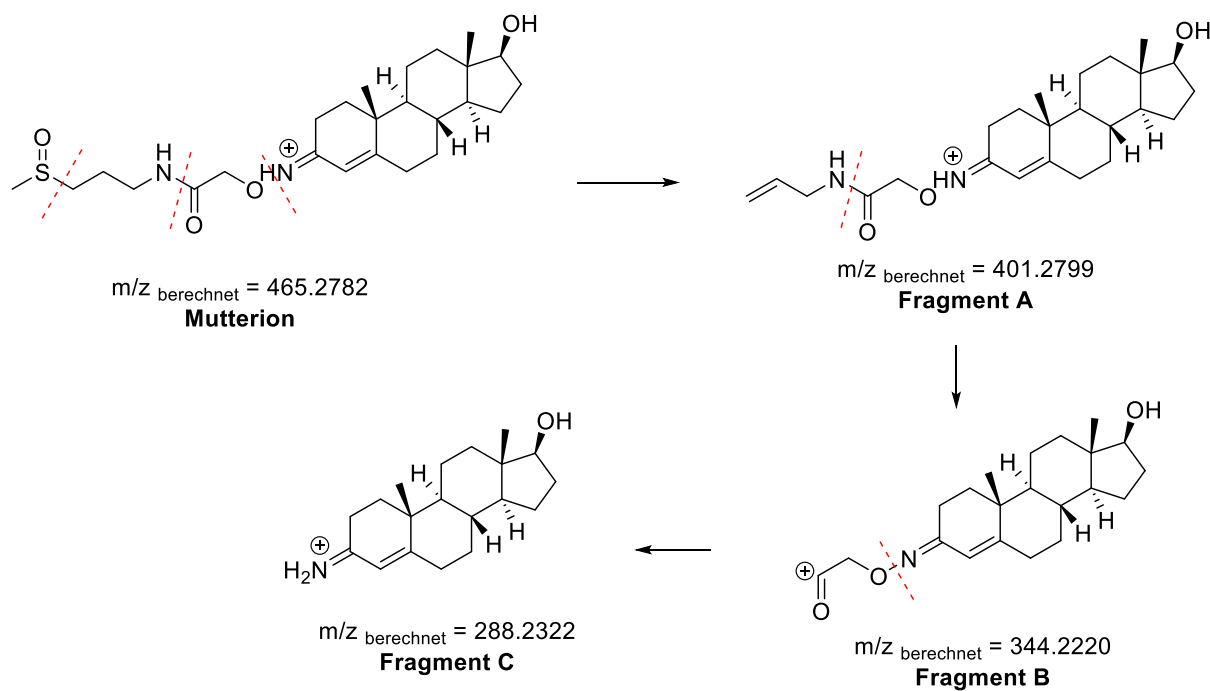


Abbildung 52 MS²-Spektrum des Testosteron-Adduktes der HCD-Fragmentierung des neuen Sulfoxid-basierten Reagenzes **64**.

65-Te bildet vier intensive Produktionen mit m/z = 534.30 (A), 529.37 (B), 570.30 (C) und 288.23 (D) (Schema 38). Bei der Spaltung von **65**-Te entstehen drei intensive Produktionen mit m/z = 401.28 (A), 344.22 (B) und 288.23 (C) (Schema 39).



Schema 38 Bei der MS-induzierten Spaltung des neuen Sulfoxid-basierten Reagenz **65** Testosteron-Adduktes, entstehen hauptsächlich vier Fragmente mit $m/z = 534.30$ (A), 529.37 (B), 570.30 (C) und 288.23 (D).



Schema 39 Fragmentierung des neuen Sulfoxid-Reagenz **65-Te**. Bei der MS-induzierten Spaltung werden drei intensive Produktionen ($m/z = 401.28$ (A), 344.22 (B) und 288.23 (C)) generiert.

3.3.3.5 Vergleich der Fragmentierungseigenschaften der untersuchten Addukte

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Fragmentierungseigenschaften der Testosteron-Addukte hinsichtlich der Spaltungseffizienz und der Selektivität der Spaltung verglichen. Die Spaltungseffizienz besagt wie „einfach“ die Spaltung der Addukte erfolgt. Es wird folglich analysiert bei welchem Energiewert die Spaltung stattfindet. Die Selektivität der Spaltung entspricht der „Sauberkeit“ der Fragmentierung. Daher wird untersucht wie viele verschiedene Fragmente bei der Spaltung gebildet werden. Eine selektive Spaltung führt zur Entstehung eines einzelnen Produkts, wohingegen bei einer nicht-selektiven Spaltung viele unspezifische Fragmente entstehen. Zudem wird genauer auf die Unterschiede der beiden Fragmentierungsprozesse CID und HCD eingegangen.

Spaltungseffizienz:

Alle Addukte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spaltungseffizienz im CID-Prozess kaum. Die Mutterionen aller Addukte sind bei einer CID von 25 bis 30% vollständig gespalten. Im HCD Prozess sind die Mutterionen bei einer HCD von 30 bis 60 vollständig gespalten.

Tabelle 4 zeigt die CID- und HCD-Energiewerte bei der die Mutterionen vollständig fragmentiert sind, sowie die Energiewerte ab denen ein Fragment intensiver ist als das Mutterion.

		Intensität Fragmention > Mutterion	Mutterion vollständig gespalten
Te-Amplifex®-Reagenz 60	CID	15	25
	HCD	20	30
Te-Carell-Reagenz 61	CID	20	30
	HCD	25	40
Te-Girard T®-Reagenz 59	CID	25	30
	HCD	45	60
Te-Sulfoxid-Reagenz 65	CID	20	30
	HCD	20	35
Te-Sulfoxid-Reagenz 64	CID	20	30
	HCD	35	45

Im CID-Prozess ist die Höhe der Fragmentierungsenergie nicht entscheidend. Eine resonanzbasierte Spaltung, wie die CID-Fragmentierung, läuft spezifischer ab als nicht-resonanzbasierte Spaltungen. Je nach Energiewert kann spezifisch eine Position im Molekül selektiv gespalten werden. Das bedeutet, dass im CID-Prozess ein höherer Energiewert nicht unbedingt von Nachteil für eine spezifische Fragmentierung sein muss. Im HCD-Prozess ist es von Vorteil, wenn die Fragmentierung bei einem niedrigen Energiewert stattfindet. Das Mutterion des *Amplifex® 60* Adduktes ist bereits bei einer HCD von 30 vollständig gespalten. Das neue Sulfoxid-Reagenz ohne permanente Ladung scheint ebenfalls effizient zu brechen. Bei einer HCD von 35 ist das Mutterion vollständig gespalten. Das Mutterion des *Carell-Reagenz 61* Adduktes ist bei einer HCD von 40 vollständig fragmentiert. Beim neuen Sulfoxid-

Reagenz mit permanenter Ladung ist das Mutterion bei einer HCD von 45 vollständig fragmentiert. Das Mutterion des Testosteron-Adduktes von *Girard T 59* ist erst bei einer HCD von 60 vollständig gespalten.

Im nachfolgenden Abschnitt wird genauer auf die Spaltungsselektivität der Testosteron-Addukte eingegangen.

Selektivität der Spaltung:

Die Messungen konnten zeigen, dass eine CID-induzierte Spaltung im Allgemeinen spezifischer erfolgt als eine HCD-induzierte Spaltung. Die HCD-Fragmentierung führt bei fast allen Addukten zur Bildung einer Vielzahl unspezifischer Fragmente, wohingegen die CID-Spaltung zu wenigen spezifischen Fragmenten führt. Wie am Anfang des Abschnittes 3.3.3 beschrieben, nimmt die Sensitivität der Methode durch die Entstehung unspezifischer Fragmente ab. Eine Ausnahme stellt das *Amplifex*®-Reagenz **60** Addukt dar, welches auch im HCD-Prozess selektiv fragmentiert. Sogar bei höheren HCD-Energien ist nur ein intensives Produktion sichtbar. Zudem werden auch bei höheren HCD Energien keine unspezifischen Fragmente gebildet (3.3.3.1). Auch bei der selektiveren CID-Spaltung wurden Unterschiede in der Spaltungsselektivität gefunden. So entstehen bei der CID-Spaltung der beiden neuen Sulfoxid-Reagenzien **64** und **65** (3.3.3.4) mehrere Produktionen, wohingegen die Spaltung des *Amplifex*®- **60** (3.3.3.1), *Carell- 61* (3.3.3.2) und *Girard T 59* Adduktes (3.3.3.3) jeweils nur ein intensives Produktion liefert. Wie bereits beschrieben, ist eine unspezifische Fragmentierung ungünstig, da sie die Sensitivität der Methode herabsetzt. Die Intensität einzelner Signale ist von der „Sauberkeit“ des Gesamtspektrums abhängig. Da die Gesamtzahl an Ionen im Gerät limitiert ist, wird die Intensität der einzelnen Fragmentionen durch die Entstehung mehrerer Fragmente vermindert.

Schlussfolgerungen:

Das *Amplifex*® Reagenz scheint die anderen Reagenzien sowohl im CID als auch HCD-Prozess hinsichtlich Fragmentierungseffizienz und Selektivität der Spaltung zu übertreffen. Die kleine Molekülgröße des *Amplifex*®-Reagenz **60** scheint ideal für eine selektive Spaltung, also die Entstehung weniger spezifischer Fragmente, zu sein. Für die Entwicklung neuer Derivatisierungsreagenzien sollte somit eine einfache Struktur mit wenigen potentiellen Bruchstellen angestrebt werden. Je nach Anwendung sind jedoch auch Designermoleküle gefragt, die eine schnelle Umsetzung oder gute Löslichkeit mit dem Zielanalyten ermöglichen. So ist das Reagenz **61**, durch die hohe Affinität zur DNA auf Grund der Aromaten-*Stacking*-Effekte ideal für die Detektion abasischer Stellen im Genom. Allerdings scheint das Reagenz nicht ideal für Geräte mit HCD-Fragmentierung zu sein, da die Entstehung vieler unspezifische Produktionen zu einer Verminderung der Sensitivität führen kann. Im Allgemeinen lässt sich nicht eindeutig sagen, ob der Stickstoffverlust einen Vorteil gegenüber der

Sulfoxidfragmentierung bringt. Die stärkere Fragmentierung des Sulfoxid-Reagenzes **64** ist auf die leichtere Abspaltung der NMe₃-Gruppe zurückzuführen. Interessant ist auch, dass das Addukt des *Girard T* Reagenz trotz seiner kleinen Molekülgröße im HCD-Prozess viele unspezifische Fragmente bildet. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Hydrazin-Derivate zu unspezifischer Fragmentierung neigen.^[66] Daher sollten neue Keto-reaktive Reagenzien bestenfalls Hydroxylamin-basiert sein.

3.3.4 Zusammenfassung Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Sulfoxid-basierten Reagenzien **64** und **65** zur Derivatisierung von Keto-Analyten erfolgreich hergestellt. Testreagenz **64** konnte in einer Gesamtausbeute von 56% über 4 Stufen in hoher Reinheit hergestellt werden. Reagenz **65**, mit permanent geladener Trimethylamin-Gruppe, wurde in einer Gesamtausbeute von 18% über 6 Schritte in reiner Form dargestellt.

Zur Evaluierung der sensitivitätssteigernden Eigenschaften der Reagenzien wurde das Steroid Testosteron (**62**) mit den neuen Reagenzien **64** und **65** derivatisiert und über die HPLC aufgereinigt. In Zusammenarbeit mit *Sarah Schiffrers* wurden die LOD-Werte der Testosteron-Addukte gemessen und mit underivatisiertem Testosteron verglichen. Zum Vergleich wurden die LOD-Werte der Testosteron-Addukte der kommerziell erhältlichen Reagenzien *Amplifex*® (**60**) und *Girard T* (**59**), sowie des in der *Carell* Gruppe entwickelten Reagenzes **61** bestimmt. Durch Derivatisierung mit den neuen Reagenzien wird Testosteron im positiven ESI-MS viel leichter ionisiert und produziert während des MS/MS effizient charakteristische Produktionen im Vergleich zu unterivatisiertem Testosteron. Durch diesen Signalverstärkungseffekt kann Testosteron auch bei niedrigeren Konzentrationen gemessen werden. Die Messungen zeigten, dass die neuen Sulfoxid-basierten Reagenzien **64** und **65** keine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Sensitivitätssteigerung zum *Amplifex* Reagenz **60** oder dem *Carell*-Reagenz **61** darstellen. Da jedoch bereits das underivatisierte Testosteron **62** eine sehr gute MS-Signalantwort zeigt, wäre die Untersuchung eines Analyten, der eine schlechtere Ionisierung zeigt, interessant um den Effekt der Signalverstärkung genauer zu untersuchen. Für die Anwendung in biologischen Flüssigkeiten wäre zudem eine Untersuchung der Löslichkeit der verschiedenen Reagenzien sowie der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber Testosteron **62** von großem Interesse.

Um die Fragmentierungseigenschaften der neuen Reagenzien mit den anderen Derivatisierungsreagenzien zu vergleichen, wurden in Zusammenarbeit mit *Michael Stadlmeier* Messungen an einem *Orbitrap* Gerät durchgeführt. Hierfür wurden die verschiedenen Testosteron-Addukte hinsichtlich ihrer Fragmentierung bei verschiedenen CID sowie HCD-Energien untersucht und verglichen.

Die Messungen konnten folgendes zeigen:

Ergebnisteil

- CID-induzierte Spaltung ist spezifischer als die HCD-Fragmentierung
- Eine kleine Molekülgröße ist ideal für eine selektive Spaltung
- Addukte der Hydrazin-Derivate fragmentieren stärker als Addukte der Hydroxylamin-Derivate
- Es ist kein Vorteil der Sulfoxidspaltung gegenüber dem Stickstoffverlust erkennbar

Ziel der Entwicklung neuer Derivatisierungsreagenzien sollten möglichst einfache Strukturen sein, mit wenigen potentiellen Bruchstellen. Zudem sind Hydroxylamin-Derivate den Hydrazin-Derivaten vorzuziehen, da diese selektiver fragmentieren. Je nach Anwendung sind jedoch auch Designermoleküle gefragt, die eine schnelle Umsetzung oder gute Löslichkeit mit dem Zielanalyten ermöglichen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien und Methoden

Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen unter Verwendung von Standard-Schlencktechnik unter Schutzgas und ausgeheizten Glasgeräten durchgeführt. Die Glasgeräte wurden vor ihrer Verwendung unter Hochvakuum mit einer Heißluftpistole ausgeheizt. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Bachem*, *ABCR*, *Acros Organics*, *Fluka*, *Carbosynth* und *TCI Europe* bezogen und falls nicht anders vermerkt, direkt verwendet. Wasser wurde, falls nicht anders angegeben in destillierter Form aus der Hausleitung bezogen. Die Lösungen zum Waschen der synthetisierten Verbindungen waren wässrig und mit dem jeweils angegebenen Salz gesättigt. Die Lösungsmittel zur Extraktion und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor ihrer Verwendung mittels Destillation aufgereinigt. 3 Å Molsieb zum Trocknen von Lösungsmittel wurde von VWR bezogen.

Doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)

Für biochemische Untersuchungen und als Herstellung flüssiger Phasen für die HPLC, sowie als Lösungsmittel für Reaktionen wurde doppelt destilliertes Wasser (Bidestwasser) mit Hilfe einer Milli-Q Plus-Anlage mit einer QPAK® 2 Kartusche erzeugt.

Dünnschichtchromatographie

Zur Reaktionskontrolle wurden die Fertigplatten Kieselgel F 254 von *Merck* verwendet. Aromatische Verbindungen wurden unter einer UV-Lampe (254 nm und 366 nm) sichtbar gemacht. Aminverbindungen wurden durch Anfärben der Substanz mit einer Ninhydrin-Lösung angefärbt (0.3 g Ninhydrin, 3 mL Eisessig in 100 mL *n*-Butanol) und andere Substanzen mit einer CAN-Lösung (10% Schwefelsäure, 120 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·24H₂O und 5 g (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ in 800 mL Wasser) oder einer Kaliumpermanganat-Lösung sichtbar gemacht

Entsalzung (Sep-Pak).

Die Entsalzung der Reagenzvorstufen erfolgte über HyperSep™ C18 Kartuschen der Firma *Thermo Scientific* nach Herstellervorschrift.

Gefriertrocknung

Zur Entfernung von Wasser und Acetonitril wurde eine *Alpha 2-4 LD plus*-Lyophilie von *Christ* verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytischen Umkehrphasen-HPL-Chromatogramme wurden an einer *Waters*-Anlage (alliance 2695 mit Photodiode Array Detector 2996) mit einer VP 250/10 Nucleodur 100-5 C₁₈ eC-Säule beziehungsweise einer CC 250/4 Nucleosil N 120-3 C₁₈-Säule von *Machery-Nagel*

aufgenommen. Als Eluenten wurden Gemische aus Puffer-Lösungen mit folgenden Zusammensetzungen verwendet: Puffer A: 0.1M Triethylammoniumacetat-Lösung; Puffer B: 0.1M HNEt₃OAc in 80% MeCN_(aq). Für die pufferfreien Bedingungen, wurde als flüssige Phase Wasser (Laufmittel A) und 80% Acetonitril in Wasser (Laufmittel B) verwendet. Der Fluss betrug 0.5 mL/min. Zur präparativen Umkehrphasen-HPLC wurde eine *Waters*-Anlage (1525EF mit einem 2487 UV-Detektor), eine CC 250/4 Nucleosil 120-3 C₁₈-Säule, beziehungsweise eine VP 250/10 Nucleodur 100-5 C₁₈eC-Säule von Machery-Nagel und das oben beschriebene Puffersystem oder ein System aus H₂O/Acetonitril pufferfrei als flüssige Phase verwendet (Fluss 5 mL/min).

Infrarotspektroskopie

IR-Spektren wurden an einem Spectrum BX FT-IR System von *Perkin Elmer* mit einem DuraSamplIR II Messkopf von *Smiths* und einer Diamant-ATR (*Attenuated Total Reflection*) Einheit ohne weitere Präparation der Proben aufgenommen. Zur Messung wurden die Proben in geringen Mengen Aceton oder DCM gelöst, die Lösung auf den Messkopf aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels konnte der entstandene Probenfilm vermessen werden. Die Wellenzahlen wurden in cm⁻¹ angegeben. Die Intensität der Signale wurden mit s (stark), m (medium), w (schwach) konkretisiert. Die Bezeichnung br steht für sehr breite Signale.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Einige ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren wurden im Automationsbetrieb an einem *Bruker* ARX 400 (400 MHz für ¹H) aufgenommen. Weitere ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- sowie sämtliche 2D-Spektren (300, 400, 600 und 800 MHz jeweils für ¹H) wurden von der NMR-Abteilung der LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN, Department Chemie (Haus F), an einem *Bruker* ARX 300, Varian Inova 400, an einem *Bruker* ARX 600 und an einem *Bruker* ARX 800 gemessen. ¹³C-NMR-Spektren wurden ¹H-entkoppelt aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) angegeben und bezieht sich auf die Mitte des Kopplungsmusters oder bei Multipletts auf deren Ausdehnung. Die Kalibration der Spektren erfolgte über das Lösungsmittel-Restsignal (CDCl₃: $\delta^1\text{H} = 7.26 \text{ ppm}$, $\delta^{13}\text{C} = 77.16 \text{ ppm}$, DMSO-d₆: $\delta^1\text{H} = 2.50 \text{ ppm}$, $\delta^{13}\text{C} = 39.52 \text{ ppm}$, D₂O: $\delta^1\text{H} = 4.65 \text{ ppm}$, CD₃OD: $\delta^1\text{H} = 3.31 \text{ ppm}$, $\delta^{13}\text{C} = 49.00 \text{ ppm}$). Die Multiplizitäten der Signale wurden als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), br (breites Singulett), m (Multiplett) und deren Kombinationen angegeben. Die angegebenen Daten sind phänomenologisch, d.h. sie entsprechen der Erscheinung des Signals und nicht der theoretisch zu erwartenden Multiplizität. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) sowie jeweils als ihr Betrag angegeben. Sie wurden aus *Lorentz-zu-Gauss* transformierten ¹H-NMR-Spektren abgelesen und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf H-H-Kopplungen. Die Zuordnung der Signale in ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Spektren erfolgte mit der Hilfe von 2D-Experimenten (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY, NOESY).

Massenspektrometrie (MS, HRMS)

Wurde auf dem Spektrometer Finnigan LTQ-FT (ESI) oder Thermo Finnigan MAT 95 (EI) von der MS-Abteilung der LUDWIG-MAXIMILIAN-UNIVERSITÄT, Department Chemie (Haus F) durchgeführt. Die Zuordnung bezieht sich, falls nicht anders angegeben, auf das natürlich am häufigsten vorkommende Isotop.

pH-Meter

Zum Einstellen von pH-Werten wurde das Gerät *MP 220* von *Mettler Toledo* verwendet, das vor jeder Messreihe durch Lösungen von pH 7.0 und 4.0 geeicht wurde.

Rotationsverdampfer

Zum Entfernen der Lösemittel *in vacuo* wurde der Rotationsverdampfer *Laborta 4000* von *Heidolph* verwendet, wobei die Temperatur des Wasserbades 40 °C betrug.

Säulenchromatographie

Die Aufreinigung der erhaltenen Rohprodukte durch Normalphasen-Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.063–0.200 mm) von *Merck* als stationäre Phase durchgeführt. Bei säureempfindlichen Produkten wurde das Kieselgel vor Benutzung mit Pyridin oder NEt_3 desaktiviert. Es wurde ein leichter Überdruck mit Hilfe von Stickstoff angelegt (*flash*-Methode).

Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurde an dem Gerät *Melting Point B-540* von *Büchi* ohne weitere Korrektur bestimmt.

UV-Vis Spektroskopie

Zur Messung von UV/VIS-Spektren wurde ein *JASCO V650*-Spektr-photometer mit eingebautem Peltier-Element verwendet. Die *Scan*-Geschwindigkeit betrug meist 100 nm/min, das Wellenlängenintervall 0.5 nm. Als Blindprobe wurde das jeweilige Lösungsmittel in der jeweiligen Küvette verwendet.

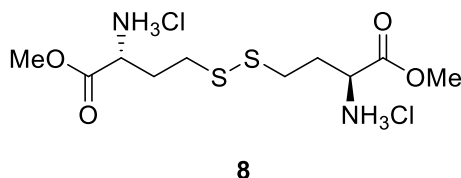
Zentrifuge

Zum Sedimentieren diente eine MiniSpin-Zentrifuge (Eppendorf).

4.2 Synthesevorschriften

4.2.1 Synthese von isobaren Markierungsreagenzien

Methyl (2*R*)-2-amino-4-([(3*S*)-3-amino-4-methoxy-4-oxobutyl] disulfanyl) butanoat Hydrochlorid (**8**)



DL-HomoHomocystin **4** (6.00 g, 22.3 mmol, 1.0 Äq) wurde unter Ar-Atmosphäre in MeOH_{abs} (80 mL) gelöst. Die farblose Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise Thionylchlorid (6.48 mL, 89.4 mmol, 4.0 Äq) zugegeben. Die resultierende farblose Reaktionslösung wurde über 3 h langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weiter gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. **8** (8.24 g, 22.3 mmol, quantitativ) wurde als farbloser Schaum erhalten.

R_f: 0.38 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH₄OH).

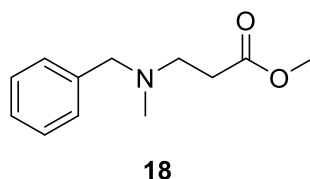
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ = 4.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.86 (s, 6H), 2.84 (m, 4H), 2.47 – 2.22 (m, 4H) ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ = 170.5, 53.9, 52.6, 33.6, 30.9 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₀H₂₁N₂O₄S₂⁺ [M+H]⁺: 297,0937; gefunden: 297,0938 *m/z*.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3373 (m), 2854 (m), 2611 (w), 2003 (s), 1738 (S), 1591 (m), 1503 (m), 1439 (s), 1224 (m), 1139 (w), 860 (m).

Methyl 3-[benzyl(methyl)amino]propanoat (**18**)



Methyl-3-bromopropanoat **17** (3.00 g, 18.0 mmol, 1.0 Äq) und *N*-Methyl-1-phenylmethanamin **16** (2.18 g, 18.0 mmol, 1.0 Äq) wurden zusammen in Acetonitril (120 mL) gelöst. Nach 2 min Rühren auf Raumtemperatur, wurde Na₂CO₃ (19.0 g, 180 mmol, 10.0 Äq) zugegeben und die Temperatur für 24 h auf 70 °C erhöht. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt, der Feststoff abfiltriert und das Filtrat mit DCM (120 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit 0.5 M NaOH (3 × 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das

Trockenmittel wurde abfiltriert und *in vacuo* eingengt. So wurde **18** als leicht gelbliches Öl (3.44 g, 16.5 mmol, 92%) erhalten.

R_f : 0.60 (DCM/MeOH 10:1)

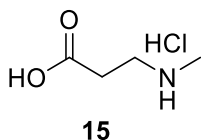
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.30 – 7.18 (m, 5H), 3.63 (s, 3H), 3.48 (s, 2H), 2.71 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 173.0, 138.9, 128.9, 128.2, 127.0, 62.1, 52.6, 51.6, 41.9, 32.8 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 208,1332; gefunden: 208,1331 m/z .

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 2950 (w), 2841 (w), 2790 (w), 1737 (s), 1495 (w), 1452 (m), 1236 (m), 1357 (w), 1325 (w), 1202 (m), 1168 (s), 1125 (m), 1975 (w), 1038 (m), 1025 (m).

3-(Methylamino)propionsäure hydrochlorid (**15**)



In einem trockenen Schlenkrohr, wurde Methyl 3-[benzyl(methyl)amino]propanoat **18** (1.00 g, 4.82 mmol, 1.0 Äq) in MeOH (60 mL) gelöst. Die Atmosphäre des Rohres wurde mit Stickstoff geflutet und Pd/C (100 mg, 10 wt%) wurde in kleinen Portionen zur Lösung gegeben. Ein doppelschichtiger Latex Ballon gefüllt mit H_2 wurde am Schlenkrohr angebracht und die Reaktionslösung wurde für weitere 16 h auf Raumtemperatur gerührt. Pd/C wurde über Kieselgur abfiltriert und *in vacuo* eingengt. Das leicht flüchtige Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Der Methylester **19** wurde in 5 M HCl gelöst und für 8 h unter Reflux erhitzt. Die Reaktionslösung wurde eingengt und es wurde aus MeOH/ Et_2O umkristallisiert. **15** (478 mg, 3.42 mmol, 71%) wurde als farblose hygroskopische Kristalle erhalten.

R_f : 0.15 (DCM/MeOH 10:1).

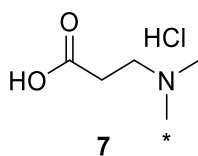
Smp.: 89 – 92 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ = 3.28 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.81 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.72 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 174.1, 44.4, 33.0, 29.9 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 104,0706; gefunden: 104,0706 m/z .

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3376 (w), 2968 (s), 2819 (s), 1729 (s), 1557 (w), 1465 (m), 1402 (s), 1351 (w), 1289 (w), 1189 (s), 1156 (s), 1024 (s).

3-(Methyl[(¹³C)methyl]amino)propionsäure Hydrochlorid (7)

Allgemeine Vorschrift 1 (AV1) 3-(Methylamino)propionsäure Hydrochlorid **15** (401 mg, 2.87 mmol, 1.0 Äq) wurde in 88% Ameisensäure (1.79 mL, 44.8 mmol, 15.6 Äq) gelöst. (¹³C)-Formaldehyd (20% in H₂O; 1.00 g, 6.45 mmol, 2.3 Äq) wurde zugegeben und die Reaktionslösung in einer Mikrowelle (110 °C, 100 W, 1 h) erhitzt. Im Anschluss wurde konzentrierte HCl (200 µL) beigelegt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Überschüssige Ameisensäure wurde mehrfach mit Toluol ko-evaporiert. Der erhaltene leicht gelbliche Feststoff wurde aus MeOH/Et₂O umkristallisiert. So wurde **7** (383 mg, 2.48 mmol, 86%) als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.

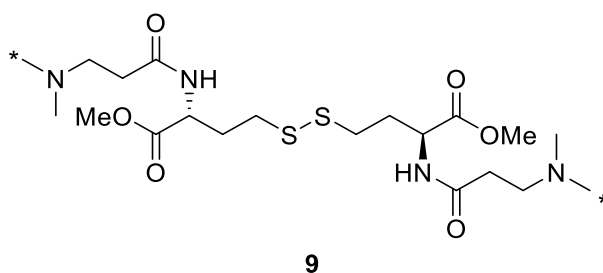
Smp.: 183 °C.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.30 (td, *J* = 6.7, 3.0 Hz, 2H), 2.97 – 2.60 (m, 8H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ = 174.1, 53.1, 43.3, 42.8, 28.8 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₄¹³CH₁₂NO₂⁺ [*M*+*H*]⁺ 119,0896; gefunden 119,0896 *m/z*.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2957(m), 2692 (m), 2592 (w), 2481 (w), 1717 (s), 1468 (w), 1420 (m), 1370 (w), 1300 (w), 1201 (s), 1161 (m), 1006 (w), 966 (m), 854 (s), 798 (m).

Dimethyl-4,4'-disulfanediyl(2*R*,2'*S*)-bis(2-(3-(methyl(methyl-¹³C)amino)-propanamido)-butanoat) (9)

Allgemeine Vorschrift 2 (AV2) In einem trockenen und mit Argon gefluteten Schlenkkolben, wurden 3-(Methyl[(¹³C)methyl]amino)propionsäure Hydrochlorid **7** (220 mg, 1.42 mmol, 2.2 Äq) und Methylester **8** (238 mg, 645 µmol, 1.0 Äq) in 5 mL DMF_{abs} gelöst. Triethylamin (461 µL, 2.26 mmol, 3.5 Äq), HOBt (218 mg, 1.61 mmol, 2.5 Äq) und EDC·HCl (321 mg, 1.68 mmol, 2.6 Äq) wurden zugegeben und für 2 h auf 60 °C erhitzt. Die resultierende orangefarbene Suspension wurde *in vacuo* eingedunstet. Nach säulenchromatographischer

Experimenteller Teil

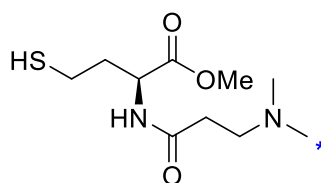
Aufreinigung (Silica, DCM/MeOH 16:1), wurde **9** (300 mg, 1.21 mmol, 85%) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f : 0.20 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH_4OH).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 4.57 (ddd, J = 8.5, 4.8, 3.1 Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 2.83 – 2.59 (m, 8H), 2.46 – 1.99 (m, 20H).

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{18}^{13}\text{C}_2\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 497,2373; gefunden: 497,2379 m/z .

Methyl (3-(methyl(methyl- ^{13}C)amino)propanoyl)-L-homocysteinat (**10**)



10

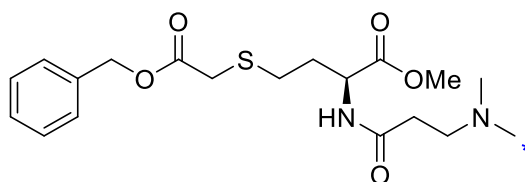
Disulfid **9** (42.0 mg, 84.6 μmol , 1.0 Äq) wurde in einem 1:3-Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ (1 mL/3 mL) gelöst. Dann wurden NaHCO_3 (30.0 mg, 355 μmol , 4.2 Äq) und TCEP·HCl (24.0 mg, 84.6 μmol , 1.0 Äq) zur Reaktionslösung gegeben und auf Raumtemperatur gerührt. Die Reduktion wurde *via* Dünnschichtchromatographie und LC-MS kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silica; DCM/MeOH 25:1) wurde **10** (19.0 mg, 169 μmol , 45%) als farbloses Öl erhalten.

R_f : 0.45 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH_4OH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): δ = 4.78 – 4.72 (m, 2H), 3.73 (s, 1H), 2.62 – 1.91 (m, 14H) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_9^{13}\text{CH}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 250,1300; gefunden: 250,1308 m/z .

Methyl (2S) -4- ([2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]sulfanyl) -2-(3-(methyl [(^{13}C)methyl] amino) propanamido)butanoat (**26**)



26

Allgemeine Vorschrift 3 (AV3): Disulfid **9** (200 mg, 400 μmol , 1.0 Äq) wurde in einem 1:3-Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ (3 mL/9 mL) gelöst. Dann wurden NaHCO_3 (141 mg, 1.68 mmol, 4.2 Äq) und TCEP·HCl (115 mg, 400 μmol , 1.0 Äq) zur Reaktionslösung gegeben und auf

Raumtemperatur gerührt. Reaktionskontrolle erfolgte über Dünnschichtchromatographie und LC-MS. Nach vollständiger Reduktion, wurde Benzylbromacetat **25** (146 μL , 920 μmol , 2.3 Äq) zugegeben und für weiter 2 h auf Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde *in vacuo* eingeeengt und mittels Säulenchromatographie (Silica, 5% MeOH in DCM) aufgereinigt. So wurde **26** (302 mg, 380 μmol , 95%) als farbloses Öl erhalten.

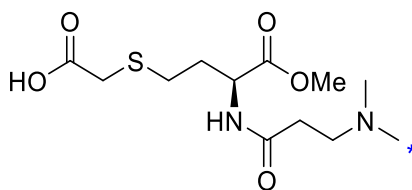
R_f: 0.26 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 7.40 – 7.28 (m, 5H), 5.15 (s, 2H), 4.53 (dd, *J* = 8.93, 4.90 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.32 (s, 2H), 2.73 – 2.56 (m, 4H), 2.44 – 1.87 (m, 10H) *ppm*.

¹³C-NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ = 174.5, 173.6, 172.0, 137.3, 129.6, 129.3, 129.3, 67.9, 56.0, 52.8, 52.6, 45.1, 34.2, 34.0, 32.0, 29.5 *ppm*.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₈H₂₉N₂O₅S⁺ [M+H]⁺: 398,1825; gefunden: 398,1826 *m/z*.

([(3*S*)-4-Methoxy-3-(3-(methyl[(¹³C)methyl]amino)propanamido)-4-oxobutyl]sulfanyl)-essigsäure (11**)**



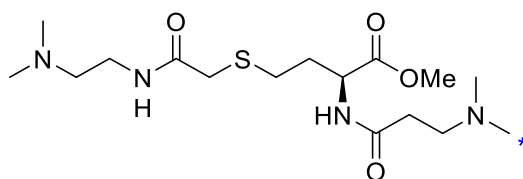
11

Allgemeine Vorschrift 4 (AV4): Unter Schlenk-Bedingungen in Argon-Atmosphäre wurde das Benzyl-geschützte Sulfid **26** (252 mg, 630 μmol , 1.0 Äq) in 10 % Ameisensäure in Methanol (4 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Palladium *black* Katalysator (252 mg, 100 wt%) gegeben und unter Rühren 2 h auf 40 °C erhitzt. Die Entschützung wurde über LC-MS und Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion, wurde der Katalysator abfiltriert, *in vacuo* eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, 25% MeOH in DCM). So wurde **11** (157 mg, 510 μmol , 81%) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 4.61 (dd, *J* = 9.5, 4.2 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.38 – 3.16 (m, 4H), 3.08 (d, *J* = 3.26 Hz, 2H), 2.94 – 2.59 (s, 10H) *ppm*.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₁H₂₃N₂O₅S⁺ [M+H]⁺: 308,1356; gefunden 308,1357 *m/z*.

Methyl (2S)-4-[(2-[(2-(dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-(methyl [(¹³C)methyl] amino)propanamido) butanoat (12)



12

Allgemeine Vorschrift 5 (AV5): Säure **11** (181 mg, 590 µmol, 1.0 Äq) wurde in DMF_{abs} (20 mL) gelöst. N,N-Dimethylethylendiamin **5** (109 mg, 708 µmol, 1.2 Äq), DIPEA (151 µL, 885 µmol, 1.5 Äq) und pyBOP (368 mg, 704 µmol, 1.2 Äq) wurden zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silica, 1:12 MeOH/DCM) lieferte **12** (163 mg, 431 µmol, 73%) als farbloses Öl.

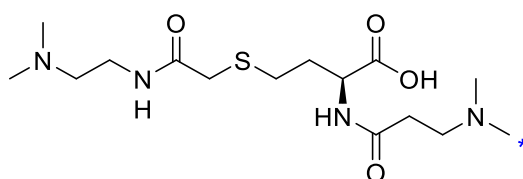
R_f: 0.23 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 4.46 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.25 (t, *J* = 6.95 Hz, 2H), 3.09 (s, 2H), 2.66 – 2.48 (m, 4H), 2.44 – 1.80 (m, 18H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 172.9, 172.3, 171.1, 57.6, 54.6, 51.5, 51.3, 44.0, 43.6, 36.8, 34.6, 34.2, 32.5, 30.7, 28.3 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₅¹³CH₃₃N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 378,2251; gefunden 378,2252 *m/z*.

(2S)-4-[(2-[(2-(Dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-(methyl [(¹³C)methyl] amino)propanamido)butansäure (13)



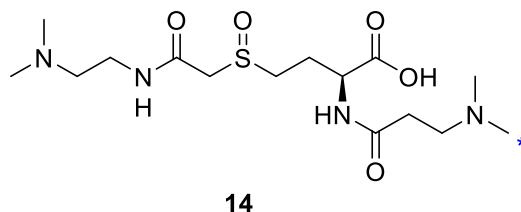
13

Allgemeine Vorschrift 6 (AV6): Methylester **12** (173 mg, 460 µmol, 1.0 Äq) wurde in einer Mischung aus H₂O (4 mL) und MeOH (10 mL) gelöst. Dann wurde LiOH (33.0 mg, 1.38 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h auf Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde *in vacuo* eingeeengt und über HyperSep™ C18 Kartuschen entsalzt (Äquilibrieren: 15 mL Acetonitril; 10 mL H₂O; Beladen: 25 mg in 0.3 mL H₂O; Waschen: 0.5 mL H₂O; Elution: 6 mL 4:1 Acetonitril/H₂O). Die Elutionslösung wurde über Nacht an der Lyophilie getrocknet. So wurde **13** (154 mg, 423 µmol, 92%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 4.33 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 6.41 Hz, 2H), 3.19 (s, 2H), 2.67 – 2.56 (m, 4H), 2.50 – 1.88 (m, 18H).

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{14}^{13}CH_{31}N_4O_4S^+$ $[M+H]^+$: 364,2094; gefunden: 364,2096 m/z .

(2S) -4-(2-([2-(Dimethylamino)ethyl] amino) -2-oxoethanesulfinyl) -2-(3-(methyl [(^{13}C)methyl]amino)propanamido)butansäure (14)

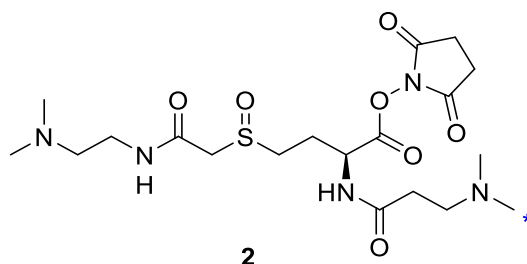


Allgemeine Vorschrift 7 (AV7): **13** (105 mg, 290 μ mol, 1.0 Äq) wurde in dest. H_2O (3 mL) gelöst. Nachdem der pH-Wert auf pH = 2 (HCl, 2 M) eingestellt war, wurde *m*CPBA (50.0 mg, 290 μ mol, 1.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 20 min auf Raumtemperatur gerührt. Die Oxidation wurde über LC-MS und Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach vollständigem Umsatz, wurde überschüssige *m*CPBA durch Extraktion mit DCM (4 x 10 mL) entfernt. Die wässrige Phase wurde an der Lyophille getrocknet, so wurde **14** (82.7 mg, 218 μ mol, 75%) als farbloser Feststoff erhalten.

1H -NMR (400 MHz, D_2O) δ = 4.52 (dd, J = 8.7, 5.1 Hz, 1H), 3.71 – 3.29 (m, 8H), 3.10 – 2.62 (m, 16H), 2.50 – 2.17 (m, 2H) ppm.

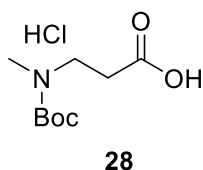
HRMS (ESI): Berechnet für $C_{14}^{13}CH_{31}N_4O_5S^+$ $[M+H]^+$: 380,2043; gefunden: 380,2042 m/z .

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (2S)-4-[(2-([2-(dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethyl)sulfonyl]-2-(3-(methyl [(^{13}C)methyl]amino)propanamido) butanoat (2)



Sulfoxid **14** (75.0 mg, 200 μ mol, 1.0 Äq) wurde in DMF (5 mL) gelöst. Es wurde trockenes Pyridin (32.0 μ L, 400 μ mol, 2.0 Äq) und NHS-TFA (84.4 mg, 400 μ mol, 2.0 Äq) zugegeben und für 4 h gerührt. Es wurde eine Reaktionskontrolle *via* LC-MS durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz (LC-MS) wurde die Reaktionslösung eingeeengt. Das resultierende gelb-braune Öl wurde in Acetonitril gelöst und mit eiskaltem Aceton gefällt. **2** (33.0 mg, 70.0 μ mol, 35%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{18}^{13}CH_{34}N_5O_7S^+$ $[M+H]^+$: 477,2207; gefunden: 477,2206 m/z .

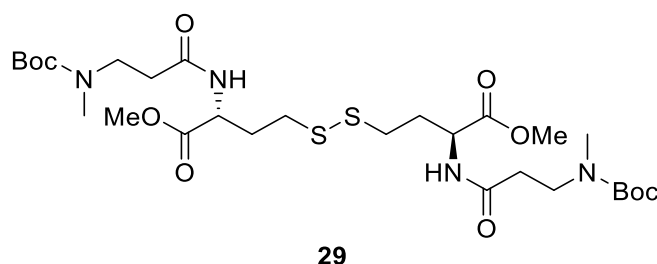
3-((tert-Butoxycarbonyl)(methyl)amino)propionsäure (28)

3-(Methylamino)propionsäure hydrochlorid **15** (3.00 g, 14.8 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit Triethylamin (4.13 mL, 29.6 mmol, 2.0 Äq) in DCM (100 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Lösung von Boc₂O (3.55 g, 16.3 mmol, 1.1 Äq) in DCM (3 mL) zugetropft. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (200 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 x 200 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und *in vacuo* eingeeengt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde aus einem EtOAc/Et₂O-Gemisch gefällt. **28** (2.58 g, 12.7 mmol, 86%) wurde in Form farbloser Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.51 (t, J = 6.8 Hz, 2H, N-CH₂), 2.89 (s, 3H, NCH₃), 2.66 – 2.56 (m, 2H, CH₂-COOH), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 177.3 (C=O), 155.8 (N-COO-tBu), 80.2 (C(CH₃)₃), 45.0 (N-CH₂), 34.6 (NCH₃), 33.2 (CH₂-COOH), 28.5 (C(CH₃)₃).

HRMS (ESI): Berechnet für C₉H₁₆NO₄ [M-H]⁻: 202,1085; gefunden: 202,1085 *m/z*.

Methyl (10R,17S) -17-(3-((tert-butoxycarbonyl) (methyl)amino) propanamido)-10-(methoxycarbonyl)-2,2,5-trimethyl-4,8-dioxo-3-oxa-13,14-dithia-5,9-diazaoctadecan-18-oat (29)

Entsprechend **AV2** wurden *N*-Boc geschütztes *N*-Methyl- β -Alanin **28** (50.0 mg, 246 μ mol, 2.0 Äq) und Methylester **8** (45.0 mg, 123 μ mol, 1.0 Äq) umgesetzt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 150:1 + 0.5% NH₄OH) lieferte **29** (82.0 mg, 79.2 μ mol, 79%) als farblosen Feststoff.

R_f: 0.37 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH₄OH).

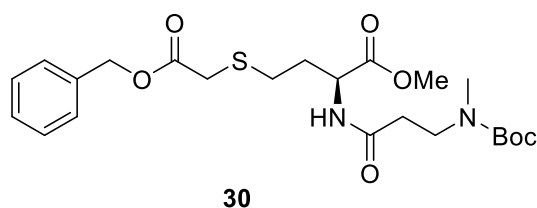
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 4.72 – 4.63 (m, 2H, CH), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 3.52 (t, 3J = 6.86 Hz, 4H, NH-CO-CH₂), 2.86 (s, 6H, N-CH₃), 2.70 (td, 3J = 7.2, 4J = 4.1 Hz, 4H, S-CH₂),

2.57 – 2.45 (m, 4H, NH-CO-CH₂-CH₂), 2.29 – 1.99 (m, 4H, S-CH₂-CH₂), 1.45 (s, 18H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 172.2 (C=OCH₃), 171.0 (NH-CO-CH₂), 162.5 (N-COO-tBu), 79.9 (C(CH₃)₃), 52.6 (OCH₃), 51.3 (CH), 45.1 (NH-CO-CH₂), 35.1 (NH-CO-CH₂-CH₂), 34.8 (N-CH₃), 34.6 (S-CH₂), 31.9 (S-CH₂-CH₂), 28.5 (C(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₂₈H₅₁N₄O₁₀S₂⁺ [M+H]⁺: 667,3041; gefunden: 667,3043 m/z.

Benzyl (S) -10-(methoxycarbonyl) -2,2,5-trimethyl -4,8-dioxo-3-oxa -13-thia-5,9-diazapentadecan-15-olat (30)



Entsprechend **AV3** wurde Disulfid **29** (120 mg, 180 μmol, 1.0 Äq) umgesetzt. **30** (71.0 mg, 148 μmol, 82%) wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 150:1 + 0.5% NH₄OH) als farbloses Öl erhalten.

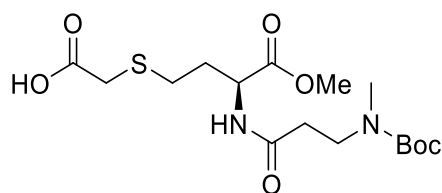
R_f: 0.41 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.39 – 7.31 (m, 5H, C₆H₅), 5.15 (s, 2H, CH₂-(C₆H₅)), 4.68 – 4.61 (m, 1H, CH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.54 – 3.46 (m, 2H, -CH₂-NCH₃-tBu), 3.25 (s, 3H, CO-CH₂-S), 2.85 (s, 2H, NCH₃), 2.65 (t, *J* = 7.19 Hz, 2H, S-CH₂-CH₂), 2.49 (t, *J* = 6.79 Hz, 2H, N-CO-CH₂), 2.17 – 1.92 (m, 2H, S-CH₂-CH₂-CH), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 172.2 (C=OOMe), 171.2 (NH-CO-CH₂), 170.2 (C=O-CH₂), 156.1 (C=O-tBu), 135.6 (C_qAr), 128.8 (C_{Ar}-H), 128.6 (C_{Ar}-H), 128.4 (C_{Ar}-H), 80.0 (C(CH₃)₃), 67.3 (CH₂-(C₆H₅)), 52.7 (OCH₃), 51.5 (CH), 45.3 (CH₂-N), 35.2 (CH₂-CH₂-N), 34.9 (N-CH₃), 33.5 (CO-CH₂-S), 31.4 (S-CH₂-CH₂-CH), 28.6 (C(CH₃)₃), 28.4 (S-CH₂-CH₂-CH) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₂₃H₃₅N₂O₇S⁺ [M+H]⁺: 483,2159; gefunden: 483,2155 m/z.

(S)-10-(Methoxycarbonyl)-2,2,5-trimethyl-4,8-dioxo-3-oxa-13-thia-5,9-diazapentadecan-15-säure (31)

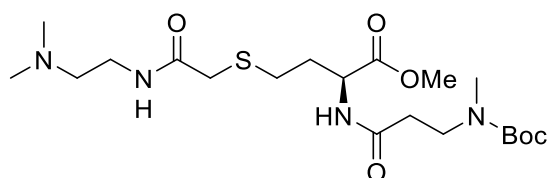


31

Entsprechend **AV4** wurde das Benzyl-geschütztes Sulfid **30** (50 mg, 104 μ mol) entschützt. **31** (34.0 mg, 86.3 μ mol, 83%) wurde als farbloses Öl erhalten.

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{16}H_{27}N_2O_7S^-$ [M-H] $^-$: 391,1544; gefunden: 391,1547 m/z .

Methyl N-(3-((tert-butoxycarbonyl)(methyl)amino)propanoyl)-S-(2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-L-homocysteinat (32)



32

Nach **AV5** wurde Säure **31** (40.0 mg, 102 μ mol) umgesetzt. So wurde **32** (34.0 mg, 73.5 μ mol, 71%) nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 30:1 + 0.5% NH_4OH) als farbloses Öl erhalten.

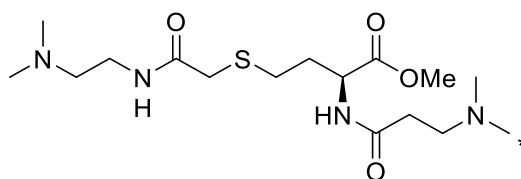
R_f: 0.29 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH_4OH).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 4.65 (td, 3J = 7.7 Hz, 4J = 4.8 Hz, 1H, CH), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.57 – 3.46 (m, 2H, CO-CH₂-CH₂-N), 3.40 – 3.31 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-NH), 3.20 (s, 2H, CO-CH₂-S), 2.86 (s, 3H, N-(CH₃)(CO₂tBu)), 2.60 (td, 3J = 7.96 Hz, 4J = 2.82 Hz, 2H, S-CH₂-CH₂), 2.54 – 2.46 (m, 2H, CO-CH₂-CH₂-N), 2.44 (t, 3J = 6.05 Hz, 2H, (CH₃)₂N-CH₂), 2.24 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.20 – 1.92 (m, 2H, S-CH₂-CH₂), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.3 (COOCH₃), 171.2 (NH-CO-CH₂-CH₂), 168.9 (NH-CO-CH₂-S), 155.3 (N-CO-OtBu), 80.1 (O=C-O-C-CH₃), 57.9 ((CH₃)₂N-CH₂), 52.7 (COOCH₃), 51.6 (CH), 45.3 (N(CH₃)₂), 45.2 (O=C-CH₂-CH₂-N), 37.3 ((CH₃)₂N-CH₂-CH₂), 36.0 (S-CH₂-C=O), 35.2 (O=C-CH₂-CH₂-N), 34.9 (N-(CH₃)(CO₂tBu)), 31.8 (S-CH₂-CH₂), 28.6 (S-CH₂-CH₂).

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{15}H_{31}N_4O_4S^+$ [M+H] $^+$: 363,2061; gefunden: 363,2059 m/z .

Methyl (2S)-4-[(2-[(2-(dimethylamino)ethyl]amino)-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-(3-(methyl [(¹³C)methyl]amino) propanamido)butanoat (12)



12

In einem Mikrowellengefäß wurde Amin **32** (166 mg, 458 µmol, 1.0 Äq) in 88% Ameisensäure (1 mL) gelöst. (¹³C)-Formaldehyd (20% in H₂O; 163 mg, 1.05 mmol, 2.3 Äq) wurde zugegeben und die Reaktionslösung in einer Mikrowelle (110 °C, 100 W, 1 h) erhitzt. Es wurde konzentrierte HCl (200 µL) zugegeben und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Überschüssige Ameisensäure wurde dreimal mit Toluol ko-evaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 15:1 + 1% NH₄OH). So wurde **12** (137 mg, 362 µmol, 79% über 2 Stufen) als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.

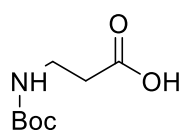
R_f: 0.23 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 4.46 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.25 (t, *J* = 6.95 Hz, 2H), 3.09 (s, 2H), 2.66 – 2.48 (m, 4H), 2.44 – 1.80 (m, 18H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄): δ = 172.9, 172.3, 171.1, 57.6, 54.6, 51.5, 51.3, 44.0, 43.6, 36.8, 34.6, 34.2, 32.5, 30.7, 28.3 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₅¹³CH₃₃N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 378,2251; gefunden 378,2252 *m/z*.

3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)propionsäure (35)



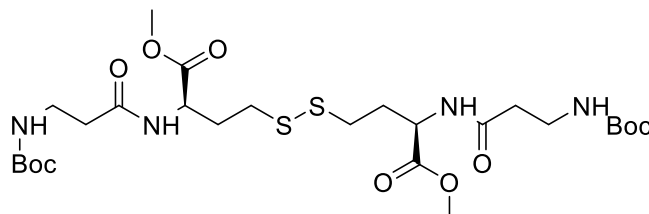
35

β-Alanin **36** (1.00 g, 11.2 mmol, 1.00 Äq) und NaOH (493 mg, 12.3 mmol, 1.1 Äq) wurden in einem *t*BuOH/H₂O-Gemisch (2.2:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Boc₂O (2.69 g, 12.3 mmol, 1.1 Äq) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (50 mL) verdünnt und mit *n*Hexan (3 x 100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde auf 5 °C gekühlt und mit gesättigter Zitronensäure auf pH = 3 angesäuert. Die saure wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 100 mL) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und *in vacuo* eingeeengt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde aus einem EtOAc/Et₂O-Gemisch ausgefällt. So wurde **35** (2.12 g, 10.4 mmol, 93%) in Form farbloser Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3,44 – 3.30 (m, 2H), 2,67 – 2,49 (m, 2H), 1,44 (s, 9H) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $C_8H_{14}NO_4^-$ $[M-H]^-$: 188,0928; gefunden: 188,0930.

Methyl (10R,17R) -17-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino) propanamido)-10-(methoxycarbonyl)-2,2,5-trimethyl-4,8-dioxo-3-oxa-13,14-dithia-5,9-diazaoctadecan-18-oat (38)



38

Entsprechend **AV2** wurden *N*-Boc-Alanin **35** (500 mg, 2.64 mmol, 2.1 Äq) und Methylester **8** (373 mg, 1.26 μ mol, 1.0 Äq) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 150:1 + 1% NH_4OH). So wurde **38** (420 mg, 657 μ mol, 52%) als farbloser Schaum erhalten.

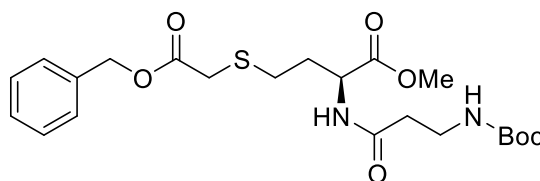
R_f: 0.38 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH_4OH).

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.63 (qd 3J = 8.3, 4J = 5.0 Hz, 2H, 2xCH), 3.69 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.39°–°3.25 (m, 4H, 2xCH₂-NH), 2.73°–°2.58 (m, 4H, 2xS-CH₂), 2.51°–°2.33 (m, 4H, 2xO=C-CH₂), 2.22°–°1.92 (m, 4H, 2xCH-CH₂), 1.36 (s, 18H, 2xC(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.5 (2C, 2x(O=C)OCH₃), 172.0 (2C, 2xNH-(C=O)-CH₂), 156.3 (2C, 2xN-COO-*t*Bu), 79.5 (2C, 2xC(CH₃)₃), 52.8 (2C, 2x(O=C)OCH₃), 51.4 (2C, 2xCH), 36.8 (2C, 2xCH₂-NH), 36.2 (2C, 2x(O=C)-CH₂), 35.2 (2C, 2xS-CH₂), 32.1 (CH-CH₂), 28.4 (6C, 2xC(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{26}H_{47}N_4O_{10}S_2^+$ $[M+H]^+$: 639,2728; gefunden: 639,2728.

Benzyl (S) -10-(methoxycarbonyl) -2,2-dimethyl -4,8-dioxo -3-oxa- 13-thia-5,9-diaza pentadecan-15-oat (39)



39

Entsprechend **AV3** wurde Disulfid **38** (420 mg, 657 μ mol) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 150:1 + 1% NH_4OH). So wurde **39** (462 mg, 986 μ mol, 75%) als farbloses Öl erhalten.

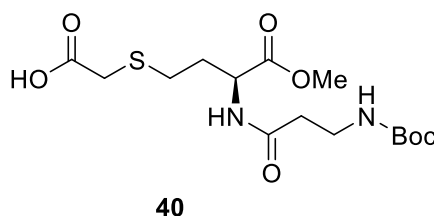
R_f: 0.56 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH_4OH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.39 – 7.32 (m, 5H, C₆H₅), 6.43 – 6.31 (m, 1H, NH), 5.16 (s, 2H, CH₂-(C₆H₅)), 4.71 – 4.62 (m, 1H, NH-CH), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (t, ³J = 5.7 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.25 (s, 2H, O=C-CH₂-S), 2.69 – 2.57 (m, 2H, S-CH₂-CH₂), 2.43 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, NH-CO-CH₂), 2.19 – 1.91 (m, 2H, CH-CH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 172.3 (COOMe), 171.7 (CH-NH-CO), 170.3 (O-CO-CH₂), 156.2 (COOtBu), 135.5 (C_qAr), 128.8 (C_{Ar}-H), 128.6 (C_{Ar}-H), 128.5 (C_{Ar}-H), 79.5 (C(CH₃)₃), 67.3 (CH₂-C₆H₅), 52.7 (OCH₃), 51.5 (CH₂-CH), 36.7 (CH₂-NH-COOtBu), 36.3 (O=C-CH₂-CH₂), 33.5 (O=C-CH₂-S), 31.4 (CH₂-CH), 28.5 (C(CH₃)₃), 28.4 (S-CH₂-CH₂) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₂₂H₃₃N₂O₇S⁺ [M+H]⁺: 469,2003; gefunden: 469,1999.

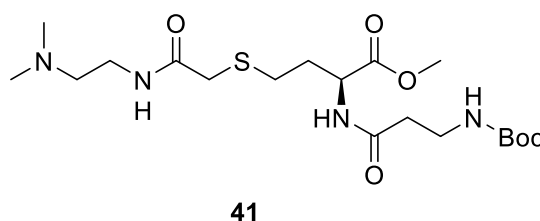
(S)-10-(Methoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,8-dioxo-3-oxa-13-thia-5,9-diazapentadecan-15-säure (40)



Entsprechend **AV4** wurde das Benzyl-geschützte Sulfid **39** (500 mg, 1.07 mmol) entschützt. So wurde **40** (319 mg, 845 μ mol, 79%) als farbloses Öl erhalten.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₅H₂₆N₂O₇NaS⁺ [M+Na]⁺: 401,1353; gefunden: 401,1354.

Methyl N-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)-S-(2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-L-homocysteinat (41)



Nach **AV5** wurde Säure **40** (80.0 mg, 211 μ mol) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 50:1 + 1% NH₄OH). So wurde **41** (50.0 mg, 112 μ mol, 53%) als farbloses Öl erhalten.

R_f: 0.62 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH₄OH).

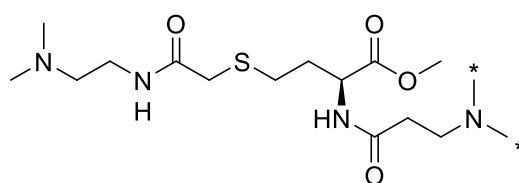
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.76 (td, ³J = 7.8, ⁴J = 4.5 Hz, 1H, CH), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.47 – 3.29 (m, 4H, CH₂-NH-COOtBu und (CH₃)₂N-CH₂-CH₂), 3.19 (s, 2H, O=C-CH₂-S), 2.61

(t, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, S-CH₂-CH₂), 2.51 – 2.40 (m, 4H, CH-NHCO-CH₂ und (CH₃)₂N-CH₂), 2.30 – 2.13 (s, 8H, (CH₃)₂N und CH₂-CH), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 172.3 (COOMe), 171.9 (CH-NH-C=O), 169.1 (O=C-CH₂-S), 156.2 (COOtBu), 79.4 (C(CH₃)₃), 57.6 ((CH₃)₂N-CH₂), 52.7 (OCH₃), 51.5 (CH), 45.1 (2C, N(CH₃)₂), 37.3(CH₂-COOtBu), 36.8, ((CH₃)₂N-CH₂-CH₂), 36.2 (CH₂-CH₂-COOtBu), 35.4 (O=C-CH₂-S), 31.7 (CH₂-CH), 28.8 (S-CH₂-CH₂), 28.5 (3C, C(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₉H₃₇N₄O₆S⁺[M+H]⁺: 449,2428; gefunden: 449,2425.

Methyl- N-(3-(di(methyl-¹³C)amino)propanoyl) -S-(2-((2-(dimethylamino) ethyl) amino)-2-oxoethyl) -L-homocysteinat (42)



42

Nach **AV1** wurde **41** (148 mg, 330 μ mol, 1.0 Äq) mit (¹³C)-Formaldehyd (20% in H₂O; 115 g, 743 mmol, 2.3 Äq) umgesetzt. So wurde **42** (49.0 mg, 129 μ mol, 39%) als leicht gelbliches Öl erhalten.

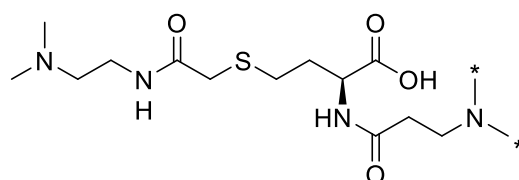
R_f: 0.23 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.69 (td, $^3J = 7.8$, $^4J = 5.0$ Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.33 (q, $^3J = 6.1$ Hz, 2H), 3.19 (s, 2H), 2.60 – 1.90 (m, 20H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 172.6, 172.4, 168.6, 57.8, 55.0, 53.7, 52.4, 50.9, 49.0, 44.5, 41.3, 37.1, 36.0, 32.1, 28.9 ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₁₄¹³C₂H₃₂N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 379,2284; gefunden: 379,2286.

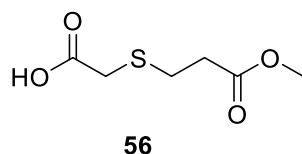
N-(3-(Di(methyl-¹³C)amino)propanoyl)-S-(2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl) -L-homocystein (43)



43

Nach **AV6** wurde **42** (49 mg, 129 μ mol) umgesetzt. **43** wurde als Rohprodukt erhalten und nicht weiter umgesetzt.

LRMS (ESI): Berechnet für C₁₃¹³C₂H₃₁N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 365,21; gefunden: 365,33.

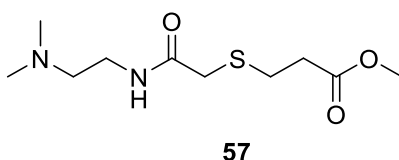
2-((3-Methoxy-3-oxopropyl)thio)essigsäure (56)

3-Mercaptopropionsäure Methylester **55** (2.00 g, 14.4 mmol, 1.0 Äq) wurde in DMF (60 mL) gelöst und Triethylamin (3.00 mL, 21.6 mmol, 1.5 Äq) und Bromessigsäure **6** (1.59 mL, 14.4 mmol, 1.0 Äq) zugegeben. Nach 12 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung eingeeengt. Der Rückstand wurde in EtOAc (250 mL) gelöst und mit Wasser (3 x 250 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. **56** (2.14 g, 12.0 mmol, 83%) wurde als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.68 (s, 3H, OCH₃), 3.27 (s, 2H, S-CH₂-COOH), 2.92 (t, ³J = 7.5 Hz, S-CH₂-CH₂), 2.64 (t, ³J = 7.5 Hz, S-CH₂-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 176.0 (COOH), 172.3 (COOCH₃), 52.1 (COOCH₃), 34.2 (S-CH₂-CH₂), 33.6 (S-CH₂-COOH), 27.3 (S-CH₂-CH₂) ppm.

HRMS (EI): Berechnet für C₆H₈O₃S [M-H₂O]: 160,0200; gefunden: 160,0188.

Methyl 3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propanoat (57)

Säure **56** (450 mg, 2.53 μ mol, 1.0 Äq) wurde in DMF_{abs} (50 mL) gelöst. Triethylamin (596 μ L, 4.30 mmol, 1.7 Äq), HOBt (376 mg, 2.78 mmol, 1.1 Äq) und EDC·HCl (533 mg, 2.78 mmol, 1.1 Äq) wurden zugefügt. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur, wurde *N,N*-Dimethylethylendiamin (276 μ L, 2.53 mmol, 1.0 Äq) zugegeben und über Nacht weiter gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM gelöst und mit neutralem (3 x 250 mL) sowie basischem Wasser (NaOH, pH = 9; 3 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde konzentriert und säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, 30:1 MeOH/DCM + 1% NH₄OH). Es wurde **57** (425 mg, 1.71 mmol, 68%) als farbloses Öl erhalten.

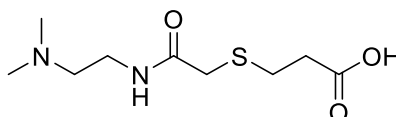
R_f: 0.43 (DCM/MeOH 10:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.35 (q, ³J = 5.7 Hz, 2H, NH-CH₂), 3.22 (s, 2H, O=C-CH₂-S), 2.82 (t, ³J = 7.1 Hz, 2H, S-CH₂-CH₂), 2.63 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂-COOCH₃), 2.42 (t, ³J = 6.1 Hz, 2H, CH₂-N(CH₃)₂), 2.23 (s, 6H, 2xN-CH₃) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 172.2 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 168.6 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 57.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 52.0 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 45.3 (2C, $\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 37.3 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 36.3 ($\text{O}=\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}$), 34.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOCH}_3$), 27.9 ($\text{S}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2$) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 249,1267; gefunden: 249,1267.

3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionsäure (**58**)



58

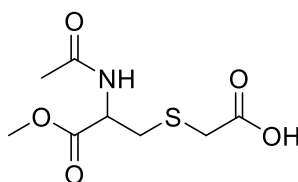
Nach **AV6** wurde Methylester **57** (425 mg, 1.71 mmol, 1.0 Äq) gespalten. **58** (401 mg, 1.71 mmol, quantitativ) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.36 (t, 3J = 6.9 Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$), 3.17 (s, 2H, $\text{O}=\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}$), 2.80 (t, 3J = 7.7 Hz, 2H, $\text{S}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2$), 2.49 – 2.42 (m, 4H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$, $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.27 (s, 6H, $\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 178.7 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 171.2 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 57.6 ($(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 44.1 (2C, $\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 37.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$), 36.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$), 36.9 ($\text{O}=\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}$), 28.8 ($\text{S}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2$) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 235,1111; gefunden: 235,1111.

2-((2-Acetamido-3-methoxy-3-oxopropyl)thio)essigsäure (**49**)



49

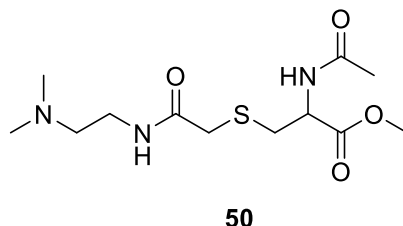
N-Acetyl-L-cystein Methylester **47** (2.55 g, 14.4 mmol, 1.0 Äq) wurde in DMF (60 mL) gelöst und Triethylamin (3.00 mL, 21.6 mmol, 1.5 Äq) sowie Bromessigsäure **6** (2.00 g, 14.4 mmol, 1.0 Äq) zugegeben. Nach 12 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung eingeeengt. Der Rückstand wurde in DCM (250 mL) gelöst und mit Wasser (3 x 250 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, so konnte **49** (3.15 g, 13.4 mmol, 93%) als farbloser Feststoff erhalten werden.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.65 (dd, 3J = 8.2, 4.8 Hz, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}$), 3.75 (s, 3H, $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3.42 – 3.33 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$), 3.17 – 2.82 (m, 2H, $\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.03 (s, 3H, $\text{O}=\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 174.7 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 174.2 ($\text{O}=\underline{\text{C}}\text{CH}_3$), 172.5 ($\text{O}=\underline{\text{C}}-\text{OCH}_3$), 53.1 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 52.3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$), 34.1 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 32.9 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 21.5 ($\text{O}=\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

HRMS (ESI): Berechnet für $C_8H_{12}NO_5S^-$ $[M-H]^-$: 234,0442; gefunden: 234,0441.

Methyl *N*-acetyl-S-(2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)cysteinat (50)



Nach **AV5** wurde Säure **49** (535 mg, 2.27 mmol) umgesetzt. So wurde **50** (513 mg, 1.68 mmol, 74%) als farbloses Öl erhalten.

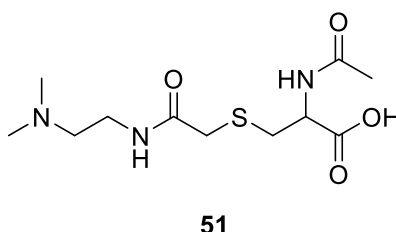
R_f: 0.59 (DCM/MeOH 4:1 + 1% NH₄OH).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.81 – 4.75 (dd, 3J = 7.36, 4.81 Hz, 1H, CH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.49 – 3.14 (m, 4H, NH-CH₂, S-CH₂-C=O), 3.08 (d, 3J = 5.2 Hz, 2H, CH-CH₂-S), 2.55 – 2.37 (m, 2H, CH₂-N(CH₃)₂), 2.24 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.04 (s, 3H, O=CCH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 171.1 (COOCH₃), 170.4 (O=CCH₃), 168.8 (O=C-NH), 58.0 (CH₂-N(CH₃)₂), 52.9 (CH), 52.9 (OCH₃), 45.4 (N(CH₃)₂), 37.2 (NH-CH₂), 37.0 (S-CH₂-C=O), 35.4 (CH-CH₂), 23.1 (O=CCH₃) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{12}H_{24}N_3O_4S^+$ $[M+H]^+$: 306,1482; gefunden: 306,1483.

***N*-Acetyl-S-(2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)cystein (51)**



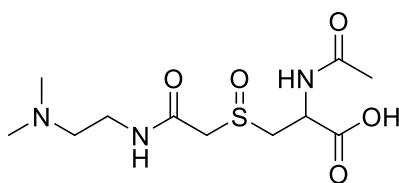
Nach **AV6** wurde Methylester **50** (122 mg, 399 μ mol, 1.0 Äq) gespalten. So wurde **51** (93.0 mg, 399 mmol, quantitativ) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.39 (dd, 3J = 7.8 Hz, 3J = 4.5 Hz, 1H, CH), 3.54 (t, 3J = 6.0 Hz, 2H, NH-CH₂), 3.37 (s, 2H, O=C-CH₂-S), 3.11 – 2.92 (m, 4H, CH-CH₂-S, CH₂-N(CH₃)₂), 2.64 (s, 6H, NCH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 179.2 (COOH), 176.2 (O=CCH₃), 175.3 (CH₂-C=O), 59.1 (CH₂-N(CH₃)₂), 56.9 (CH), 45.9 (2C, N(CH₃)₂), 38.5 (NH-CH₂), 38.0 (S-CH₂-C=O), 37.2 (CH-CH₂-S), 24.4 (O=CCH₃) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $C_{11}H_{22}N_3O_4S^+$ $[M+H]^+$: 292,1326; gefunden: 292,1325.

Acetyl((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)sulfinyl)alanin (**52**)



52

Nach **AV7** wurde Sulfid **51** (93.0 mg, 319 μ mol, 1.0 Äq) oxidiert. So wurde Sulfoxid **52** (42.0 mg, 137 μ mol, 43%) als farbloser Schaum erhalten.

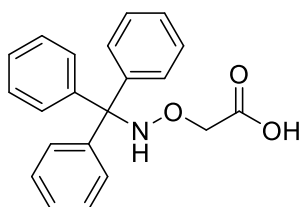
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.88 – 4.78 (m, 1H, CH), 4.02 – 3.78 (m, 2H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}$), 3.67 – 3.25 (m, 6H, CH_2-NH , $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}$, $\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.86 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.98 (m, 3H, $\text{O}=\text{CCH}_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 174.3 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$, a), 174.0 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$, b), 172.5 (COOH , a), 172.2 (COOH , b), 166.6 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$), 56.2 ($\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 56.0 ($\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}$), 52.5 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}$, a), 52.2 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}$, b), 48.1 (CH , a), 47.4 (CH , b), 43.1 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$, a), 42.6 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$, b), 34.7 ($\text{NH}-\text{CH}_2$), 21.6 ($\text{O}=\text{CCH}_3$) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 308,1275; gefunden: 308,1275.

4.2.2 Synthese von Keton/Aldehyd-reaktiven Reagenzien zur Sensitivitätssteigerung

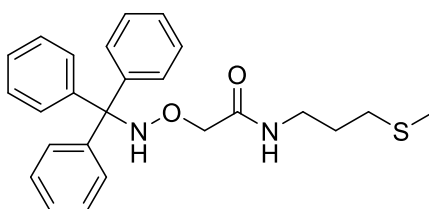
2-((Tritylamino)oxy)essigsäure (**68**)



68

2-((Tritylamino)oxy)essigsäure **68** wurde nach einer Vorschrift von *Kojima et al.* synthetisiert.^[108]

N-(3-(Methylthio)propyl)-2-((tritylamino)oxy)acetamid (**69**)



69

2-((Tritylamino)oxy)essigsäure **68** (704 mg, 2.11 mmol, 1.0 Äq) wurde unter Schlenk-Bedingungen in DCM (50 mL) suspendiert. Dann wurden HBTU (812 mg, 2.53 mmol, 3.0 Äq) und DIPEA (430 µL, 2.53 mmol, 1.2 Äq) zugegeben. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur, wurde 3-(Methylthio)propylamin **67** (666 mg, 6.33 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und für weitere 12 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (250 mL) verdünnt und mit gesättigter NH₄Cl-Lösung (3 x 250 mL) sowie gesättigter NaCl-Lösung (2 x 250 mL) gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das gelbliche Öl, wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und so wurde **69** (774 mg, 1.84 mmol, 87%) als farbloses Öl erhalten.

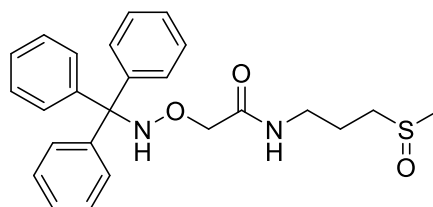
R_f: 0.82 (DCM/MeOH 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.29 – 7.17 (m, 15H, (C₆H₅)₃C), 4.19 (s, 2H, O-CH₂-C=O), 3.09 (q, ³J = 7.3 Hz, 2H, NH-CH₂), 2.28 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂-S), 1.95 (s, 3H, S-CH₃), 1.53 (p, ³J = 7.4 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂). *ppm*.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 169.3 (C=O), 143.9 (3C, 3x O-NH-C-C), 129.0 (6C, C_{Ar}-H), 128.1 (6C, C_{Ar}-H), 127.4 (6C, C_{para}-H), 74.4 (C(C₆H₅)₃), 73.4 (O-CH₂-C=O), 37.9 (NH-CH₂), 31.6 (CH₂-S), 28.5 (CH₂-CH₂-CH₂), 15.6 (S-CH₃) *ppm*.

HRMS (ESI): Berechnet für C₂₅H₂₇N₂O₂S⁻ [M-H]⁻: 419,1799; gefunden: 419,1801.

N-(3-(Methylsulfinyl)propyl)-2-((tritylamino)oxy)acetamid (70)



70

Sulfid **69** (112 mg, 266 µmol, 1.0 Äq) wurde in DCM/EtOH (10:1) gelöst. Unter Rühren wurde *m*CPBA (59.6 mg, 266 µmol, 1.0 Äq) zugegeben und für 1 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM (50 mL) verdünnt und mit Wasser gewaschen (3 x 50 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Silica, DCM/MeOH 200:1) lieferte Sulfoxid **70** (107 mg, 245 µmol, 92%) als farblosen Schaum.

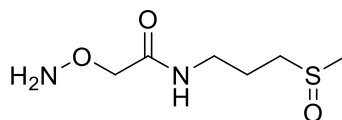
R_f: 0.43 (DCM/MeOH 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.28 – 7.18 (m, 15H, (C₆H₅)₃C), 6.30 (s, 1H, NH), 4.08 (s, 2H, O-CH₂-C=O), 3.20 (q, ³J = 6.3 Hz, 2H, NH-CH₂), 2.57 (td, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 2.3 Hz 2H, CH₂-S), 2.42 (s, 3H, S-CH₃), 1.91 – 1.76 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂). *ppm*.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 170.1 (C=O), 143.8 (3C, 3x O-NH-C-C), 129.0 (6C, C_{Ar}-H), 128.0 (6C, C_{Ar}-H), 127.2 (6C, C_{para}-H), 74.5 (C(C₆H₅)₃), 73.7 (O-CH₂-C=O), 51.8 (CH₂-S), 38.5 (S-CH₃), 37.62 (NH-CH₂), 23.02 (CH₂-CH₂-CH₂) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₂₅H₂₈KN₂O₃S⁺ [M+K]⁺: 475,1452; gefunden: 475,1451.

2-(Aminooxy)-N-(3-(methylsulfinyl)propyl)acetamid (**65**)



65

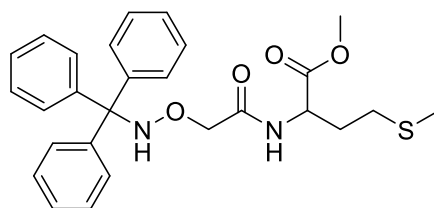
Das Trityl-geschützte Sulfoxid **70** (25.0 mg, 57.3 μ mol, 1.00 Äq) wurde in 2 %TFA in DCM gelöst. Dann wurde Triisopropylsilan (14.2 μ L, 68.7 μ mol, 1.0 Äq) zugegeben und für 10 min gerührt. Die farblose Reaktionslösung verfärbte sich intensiv gelb. Das Produkt wurde mit ddH₂O (3 x 25 mL) aus der DCM-Phase extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurde mit DCM gewaschen (3 x 25 mL) und an der Lyophille getrocknet. So wurde **65** (10.5 mg, 53.9 μ mol, 94%) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.62 (s, 2H, O-CH₂-C=O), 3.43 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H, NH-CH₂), 2.99 – 2.84 (tt, ³J = 14.3 Hz, ⁴J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-S=O), 2.70 (s, 3H, S-CH₃), 1.99 (p, ³J = 7.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 168.9 (C=O), 71.8 (O-CH₂-C=O), 49.98 (CH₂-S=O), 37.8 (NH-CH₂), 36.58 (CH₃), 21.8 (CH₂-CH₂-CH₂) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für ⁺ [M+H]⁺: 195,0798; gefunden: 194,0798.

Methyl (2-((tritylamino)oxy)acetyl)methioninat (**74**)



74

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 2-((Tritylamino)oxy)essigsäure **68** (476 mg, 1.43 mmol, 1.0 Äq) zusammen mit HBTU (652 mg, 1.72 mmol, 1.2 Äq) und DIPEA (293 μ L, 1.72 mmol, 1.2 Äq) in DMF gelöst. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur, wurde Methioninmethylester **72** (857 mg, 4.29 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und für weitere 12 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in EtOAc (100 mL) gelöst und mit Wasser gewaschen (3 x 150 mL). Die wässrige Phase wurde mit EtOAc reextrahiert, vereint, über MgSO₄ getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und erneut *in vacuo* konzentriert.

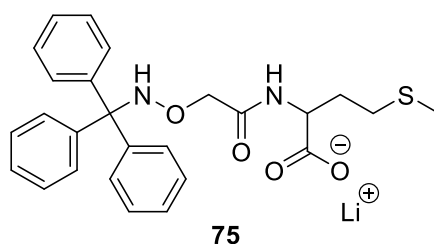
Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/iHex 1:2) lieferten **74** (574 mg, 1.20 mmol, 84%) als farblosen Feststoff.

R_f : 0.66 (DCM/MeOH 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.38 – 7.22 (m, 15H, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}$), 4.63 (td, 3J = 8.0 Hz, 4J = 5.0 Hz, 1H, CH), 4.29 (s, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-C=O}$), 3.69 (s, 3H, O-CH_3), 2.33 (t, 3J = 7.6 Hz, 2H, S-CH_2), 2.09 – 1.72 (m, 5H, CH-CH_2 , S-CH_3) ppm.

LRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 479,1999; gefunden: 479,32.

(2-((Tritylamino)oxy)acetyl)methionin (**75**)



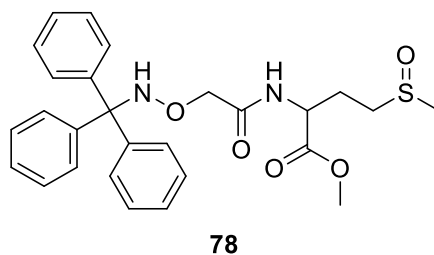
Methylester **74** (50.0 mg, 104 μmol , 1.0 Äq) wurde in THF/ H_2O (4:1) gelöst, dann wurde LiOH (4.90 mg, 208 μmol , 2.0 Äq) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur, wurde die Reaktionslösung eingeeengt und das Produkt über Nacht am Hochvakuum getrocknet. So wurde **75** (55.0 mg, 104 μmol , quantitativ) als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.18 – 6.95 (m, 15H, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}$), 4.17 (dd, 3J = 8.5 Hz, 4J = 4.2 Hz, 1H, CH), 4.10 – 3.91 (m, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-C=O}$), 2.30 – 2.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S-CH}_3$), 2.01 – 1.64 (m, 5H, S-CH_3 , CH-CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 177.4 (C=O), 170.8 (NH-C=O), 143.5 (3C, $3 \times \text{O-NH-C-C}$), 128.6 (6C, $\text{C}_{\text{Ar-H}}$), 127.9 (6C, $\text{C}_{\text{Ar-H}}$), 127.1 (3C, $\text{C}_{\text{para-H}}$), 74.0 ($\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$), 72.4 ($\text{O-CH}_2\text{-C=O}$), 53.6 (CH), 31.0 (CH-CH_2), 29.6 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 23.2 (S-CH_3 , a), 14.3 (S-CH_3 , b) ppm.

LRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 463,17; gefunden: 436,28.

Methyl 4-(methylsulfinyl)-2-(2-((tritylamino)oxy)acetamido)butanoat (**78**)



Sulfid **74** (150 g, 313 μmol , 1.0 Äq) wurde in DCM/EtOH (10:1) (30 mL) gelöst und *m*CPBA (70.0 mg, 313 μmol , 1.0 Äq) zugegeben. Nach Rühren für 1 h bei Raumtemperatur zeigte die

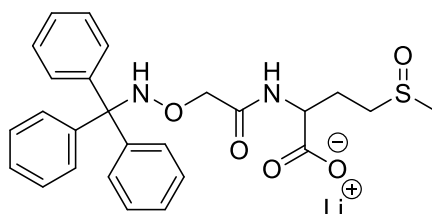
DC-Kontrolle kein Edukt mehr. Die Reaktionslösung wurde *in vacuo* eingengt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (DCM/MeOH 50:1) aufgereinigt. So wurde Sulfoxid **78** (141 mmol, 285 μ mol, 91%) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.37 – 7.24 (m, 15H, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}$), 4.64 (tt, 3J = 8.4 Hz, 4J = 4.7 Hz, 1H, CH), 4.26 – 4.13 (m, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-C=O}$), 3.72 (s, 3H, O-CH_3), 2.73 – 2.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S=O}$), 2.49 (d, 3J = 15.2 Hz, 2H, S-CH_3), 2.38 – 1.98 (m, 2H, CH-CH_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 171.2 ($\text{O-CH}_3\text{-C=O}$), 169.9 (NH-C=O), 143.7 (3C, 3x O-NH-C-C), 129.0 (6C, $\text{C}_{\text{Ar-H}}$), 128.0 (6C, $\text{C}_{\text{Ar-H}}$), 127.2 (3C, $\text{C}_{\text{para-H}}$), 74.5 ($\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$), 73.6 ($\text{O-CH}_2\text{-C=O}$), 52.7 (O-CH_3), 50.7 (CH , a), 50.5 (CH , b), 50.1 ($\text{CH}_2\text{-S=O}$, a), 50.1 ($\text{CH}_2\text{-S=O}$, b), 38.6 (S-CH_3 , a), 38.5 (S-CH_3 , b) 25.7 (CH-CH_2 , a), 25.5 (CH-CH_2 , b) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^-$ $[\text{M-H}]^-$: 493,1803; gefunden: 493,1804.

4-(Methylsulfinyl)-2-(2-((tritylamino)oxy)acetamido)butansäure (**79**)



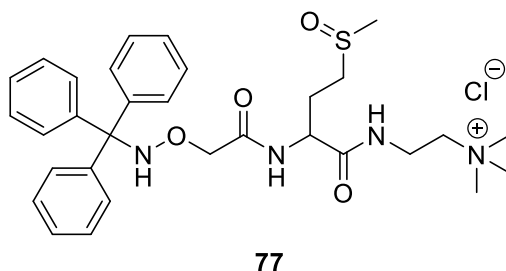
79

Methylester **75** (700 mg, 1.46 mmol, 1.0 Äq) wurde in THF/ H_2O (4:1) gelöst, dann wurde LiOH (70 mg, 2.92 mmol, 2.0 Äq) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur, wurde die Reaktionslösung eingengt. So wurde **79** (710 mg, 1.46 mmol, quantitativ) als weißer Feststoff erhalten.

R_f: 0.27 (DCM/MeOH 4:1 + 1% AcOH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.33 – 7.19 (m, 15H, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}$), 4.21 (ddd, 3J = 10.6 Hz, 4J = 7.8 Hz, 4.7 Hz 1H, CH), 4.09 – 3.79 (m, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-C=O}$), 2.72 – 2.60 (m, 2H, O-CH_3), 2.56 – 2.49 (m, 3H, S-CH_3 , a und b), 2.21 – 1.83 (m, 2H, CH-CH_2) ppm.

LRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^-$ $[\text{M-H}]^-$: 463,17; gefunden: 463,28.

***N,N,N*-Trimethyl-7-(2-(methylsulfinyl)ethyl)-5,8-dioxo-1,1,1-triphenyl-3-oxa-2,6,9-triazaundecan-11-aminium (77)**

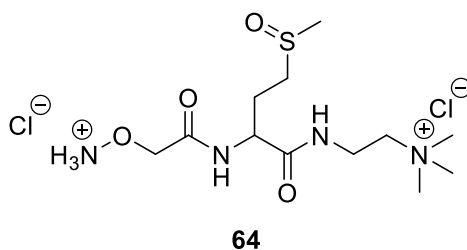
Lithium-Salz **80** (50 mg, 103 μ mol, 1.0 Äq) wurde in DMF gelöst. Es wurden HBTU (47 mg, 124 μ mol, 1.2 Äq) und DIPEA (43.8 μ L, 310 μ mol, 2.0 Äq) zugeben und für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. 2-Aminoethyltrimethylammonium Hydrochlorid **73** (22.5 mg, 124 μ mol, 1.2 Äq) wurde zugeben und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (RP-C₁₈-Silica, 80:20 H₂O/MeCN). So wurde Amid **77** (24.5 mg, 43.3 μ mol, 42%) als farbloser Schaum erhalten.

R_f: 0.27 (Wasser/Acetonitril 30:70).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.37 – 7.26 (m, 15H, (C₆H₅)₃C), 4.46 (td, ³J = 9.4 Hz, ⁴J = 5.2 Hz, CH, 1H), 4.14 – 4.02 (m, 2H, O-CH₂-C=O), 3.72 – 3.61 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.46 (t, ³J = 6.6 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.16 (s, 9H, N(CH₃)₃), 2.93 – 2.71 (m, 2H, CH₂-S=O), 2.61 (d, ³J = 6.5 Hz, 3H, S-CH₃), 2.34 – 2.05 (m, 2H, CH-CH₂) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 173.4 (C=O), 173.3 (C=O), 145.5 (3C, 3x O-NH-C-C), 130.4 (6C, C_{Ar}-H), 128.8 (6C, C_{Ar}-H), 128.1 (3C, C_{para}-H), 75.5 (C(C₆H₅)₃), 74.3 (O-CH₂-C=O), 65.7 (CH₂-N(CH₃)₃), 54.1 (3C, N(CH₃)₃), 53.5 (CH, a), 53.2 (CH, b), 50.7 (CH₂-S=O, a), 50.5 (CH₂-S=O, b), 38.2 (S-CH₃, a), 38.1 (S-CH₃, b), 34.9 (NH-CH₂-CH₂), 26.0 (CH-CH₂, a), 25.8 (CH-CH₂, b) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für C₃₁H₄₁N₄O₄S⁺ [M+H]⁺: 565,2843; gefunden: 565,2842.

2-(2-(2-(Aminooxy)acetamido)-4-(methylsulfinyl)butanamido)-*N,N,N*-trimethylethan-1-aminium (64)

N-Trityl geschütztes Amin **77** (24.5 mg, 43.3 μmol) wurde in DCM (2 mL) gelöst, dann wurde 2M HCl (2 mL) zugegeben. Die 2-Phasen Mischung wurde unter starkem Rühren für 12 h gerührt. Es wurde Wasser (5 mL) zugegeben. Die DCM Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mehrfach mit DCM gewaschen (3 x 5 mL). Die wässrige Phase wurde über Nacht an der Lyophille getrocknet. So wurde Reagenz **64** (10.6 mg, 32.9 μmol , 76%) als farbloser Feststoff erhalten.

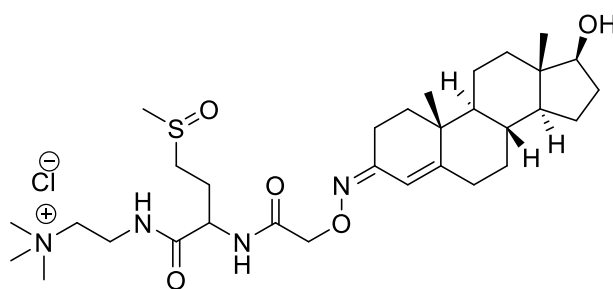
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.66 (s, 2H, O-CH₂-C=O), 4.57 – 4.45 (m, 1H, CH), 3.78 – 3.62 (m, 2H, CH₂-N(CH₃)₃), 3.47 (t, 3H, CH₂-CH₂-N(CH₃)₃), 3.15 (s, 9H, N(CH₃)₃), 3.02 – 2.82 (m, 2H, CH₂-S=O), 2.69 (s, 3H, O=S-CH₃), 2.35 – 2.10 (m, 2H, CH-CH₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 172.7 (CH-C=O-NH), 169.2 (O=C-CH₂-O), 71.6 (O-CH₂-C=O), 63.8 (CH₂-CH₂-N(CH₃)₃), 53.3 (N(CH₃)₃), 52.3 (CH), 48.5 (CH₂-S=O), 36.5 (O=S-CH₃), 33.6 ((CH₂-N(CH₃)₃), 24.0 (CH-CH₂) ppm.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+ [\text{M}]^+$: 323,1748; gefunden: 323,1748.

4.2.3 Darstellung der Testosteron-Addukte

Testosteron Addukt mit Sulfoxid-Reagenz (80)

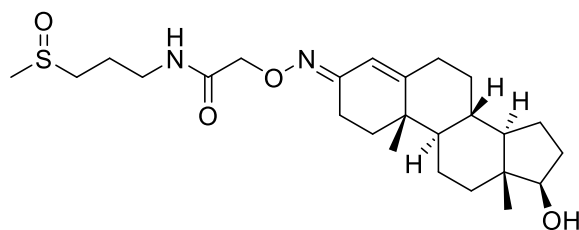


80

Allgemeine Vorschrift 8 (AV8): Testosteron **62** (44.7 mg, 155 μmol , 1.0 Äq) wurde in einem 1:1:1-Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MeCN}$ und 0.5% Ameisensäure gelöst. Zu dieser Lösung wurde Sulfoxid-Reagenz **64** (50.0 mg, 155 μmol , 1.0 Äq) gegeben und für 1 h bei 60 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen *in vacuo* wurde das Rohprodukt *via* HPLC (0% auf 70% Acetonitril in Wasser in 45 min) aufgereinigt. So wurde Addukt **80** (15.7 mg, 26.4 μmol , 17%) als farbloser Feststoff erhalten.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}^+ [\text{M}]^+$: 593,3731; gefunden: 593,3736.

Testosteron Addukt mit Sulfoxid-Reagenz (71)



71

Nach **AV8** wurde Testosteron **62** (8.91 mg, 30.9 μmol , 1.0 Äq) mit Sulfoxid-Reagenz **65** (6.00 mg, 30.9 μmol , 1.0 Äq) umgesetzt. Nach HPLC-Aufreinigung (0% auf 70% Acetonitril in Wasser in 45 min) wurde Addukt **71** (8.04 mg, 17.3 μmol , 56%) als farbloser Feststoff erhalten.

HRMS (ESI): Berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 465,2782; gefunden: 465,2779.

5 Abkürzungsverzeichnis

AcOH	Essigsäure
Äq	Äquivalente
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSSO	Disuccinimidylsulfoxid
Duplex	Reagenz-Set bestehend aus zwei isobaren Strukturen
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektrospray-Ionisation
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i> ,Isotopen-kodierte Affinitätsmarkierung
IR	Infrarotspektroskopie

Abkürzungsverzeichnis

iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
LiOH	Lithiumhydroxid
LRMS	<i>Low resolution mass spectrometry</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektroskopie
MS/MS	Tandem Massenspektroskopie
NaOAc	Natriumacetat
NEt₃	Triethylamin
Neunplex	Reagenz-Set bestehend aus neun isobaren Strukturen
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PDA	<i>photo diode array</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
RT	Raumtemperatur
pyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
SILAC	<i>stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i>
SOT	SulfOxid-Tag
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TMS	Trimethylsilyl
TMT	<i>Tandem Mass Tags</i>

Abkürzungsverzeichnis

Tr	Trityl
Triplex	Reagenz-Set bestehend aus drei isobaren Strukturen
THF	Tetrahydrofuran
UHPLC	<i>Ultra high liquid chromatography</i>
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht

6 Literaturverzeichnis

- [1] E. R. Mardis, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2008**, 9, 387-402.
- [2] S. Goodwin, *et al.*, *Nat. Rev. Genet.* **2016**, 17, 333.
- [3] J. Cox, M. Mann, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, 80, 273-299.
- [4] L. M. F. de Godoy, *et al.*, *Nature* **2008**, 455, 1251.
- [5] H. Li, *et al.*, *J. Mass Spectrom.* **2017**, 52, 319-341.
- [6] <https://hupo.org/human-proteome-project>.
- [7] J. R. Yates, *Trends Genet.* **2000**, 16, 5-8.
- [8] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299-2301.
- [9] J. Fenn, *et al.*, *Science* **1989**, 246, 64-71.
- [10] R. Juraschek, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, 10, 300-308.
- [11] A. Cristobal, *et al.*, *Analyst* **2012**, 137, 3541-3548.
- [12] Z. Zhang, *et al.*, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, 7, 427-454.
- [13] J. V. Olsen, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3, 608-614.
- [14] J. K. Eng, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5, 976-989.
- [15] D. N. Perkins, *et al.*, *ELECTROPHORESIS* **1999**, 20, 3551-3567.
- [16] W. A. Tao, R. Aebersold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 110-118.
- [17] S.-E. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 252.
- [18] M. C. Völker-Albert, *et al.*, in *Histone Variants: Methods and Protocols* (Eds.: G. A. Orsi, G. Almouzni), Springer New York, New York, NY, **2018**, pp. 61-74.
- [19] S. P. Gygi, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 9390-9395.
- [20] J. R. Whiteaker, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 10.
- [21] S. Lemeer, A. J. R. Heck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 414-420.
- [22] K. L. Norris, *et al.*, *Sci. Signaling* **2009**, 2, pe76-pe76.
- [23] S.-E. Ong, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, 1, 376-386.
- [24] R. Zhang, *et al.*, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5142-5149.
- [25] T. Geiger, *et al.*, *Nat. Methods* **2010**, 7, 383.
- [26] T. A. Neubert, P. Tempst, *Nat. Methods* **2010**, 7, 361.
- [27] M. Looso, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, 9, 1157-1166.
- [28] O. A. Ebner, M. Selbach, in *Argonaute Proteins: Methods and Protocols* (Eds.: T. C. Hobman, T. F. Duchaine), Humana Press, Totowa, NJ, **2011**, pp. 315-331.
- [29] M. Krüger, *et al.*, *Cell* **2008**, 134, 353-364.
- [30] J. W. Gouw, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, 9, 11-24.
- [31] C. M. Rose, *et al.*, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 5129-5137.
- [32] K. A. Overmyer, *et al.*, *Nat. Protoc.* **2018**, 13, 293.
- [33] P. V. Bondarenko, *et al.*, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4741-4749.
- [34] M. P. Washburn, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 242.
- [35] H. Liu, *et al.*, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4193-4201.
- [36] B. Zhang, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 2909-2918.
- [37] D. Kovanich, *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, 991-1009.
- [38] O. Chahrour, *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 113, 2-20.
- [39] N. Rauniyar, J. R. Yates, *J. Proteome Res.* **2014**, 13, 5293-5309.
- [40] S. P. Gygi, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 994.
- [41] J. Li, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2, 1198-1204.
- [42] L. I. Leichert, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 8197-8202.
- [43] P. L. Ross, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, 3, 1154-1169.
- [44] L. Choe, *et al.*, *PROTEOMICS* **2007**, 7, 3651-3660.
- [45] L. Dayon, *et al.*, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2921-2931.
- [46] A. Palmese, *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, 1631-1635.
- [47] H. Hahne, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 3716-3724.
- [48] Z. Qu, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2014**, 13, 3200-3211.
- [49] P. Kuan-Ting, *et al.*, *Antioxid. Redox Signaling* **2014**, 20, 1365-1381.
- [50] S. Shakir, *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409, 3821-3830.
- [51] Z. Li, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2012**, 11, 1582-1590.
- [52] L. Ting, *et al.*, *Nat. Methods* **2011**, 8, 937.

- [53] C. D. Wenger, *et al.*, *Nat. Methods* **2011**, 8, 933.
- [54] M. Wühr, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 9214-9221.
- [55] S. A. Gerber, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 6940-6945.
- [56] R. J. Beynon, *et al.*, *Nat. Methods* **2005**, 2, 587.
- [57] V. Brun, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, 6, 2139-2149.
- [58] S. Hanke, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2008**, 7, 1118-1130.
- [59] S. Singh, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2009**, 8, 2201-2210.
- [60] C. Ludwig, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, 11.
- [61] D. W. Powell, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24, 7249-7259.
- [62] Y. Ishihama, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, 4, 1265-1272.
- [63] S. Gao, *et al.*, *J. Chromatogr. B* **2005**, 825, 98-110.
- [64] T. Santa, *Biomed. Chromatogr.* **2011**, 25, 1-10.
- [65] T. Higashi, K. Shimada, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 875-882.
- [66] M. Star-Weinstock, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 9310-9317.
- [67] I. Athanasiadou, *et al.*, *Bioanalysis* **2012**, 4, 167-175.
- [68] A. E. DeBarber, *et al.*, *J. Chromatogr.* **2011**, 879, 1384-1392.
- [69] W. J. Griffiths, *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, 22, 81-152.
- [70] H. Hong, Y. Wang, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 322-326.
- [71] M. R. Anari, *et al.*, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4136-4144.
- [72] H. L. Lord, *et al.*, *J. Chromatogr. B* **2009**, 877, 1292-1298.
- [73] N. Rauniyar, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 26120.
- [74] R. Rahimoff, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 10359-10364.
- [75] A. Kao, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 10.
- [76] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques (Third Edition)* (Ed.: G. T. Hermanson), Academic Press, Boston, **2013**, pp. 127-228.
- [77] A. J. Lomant, G. Fairbanks, *J. Mol. Biol.* **1976**, 104, 243-261.
- [78] P. S. R. e. a. Anjaneyulu, *Biochemistry* **1988**, 27, 6844-6851.
- [79] J. Luo, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, 11.
- [80] M. L. Capobianco, *et al.*, *Molecules* **2012**, 17, 910.
- [81] M. Su, *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 11797-11800.
- [82] Y. R. Luo, *CRC Press* **2007**.
- [83] D. Fasci, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2018**, 17, 2018-2033.
- [84] J. W. Back, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, 12, 222-227.
- [85] E. J. Soderblom, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, 3395-3408.
- [86] E. J. Soderblom, M. B. Goshe, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 8059-8068.
- [87] E. V. Petrotchenko, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 10.
- [88] C. Hage, *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 14551-14555.
- [89] M. Q. Müller, *et al.*, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 6958-6968.
- [90] B. Clifford-Nunn, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, 23, 201-212.
- [91] Y. Lu, *et al.*, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 9279-9287.
- [92] H. Roberg-Larsen, *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2012**, 1255, 291-297.
- [93] U. Bussy, *et al.*, *Talanta* **2016**, 149, 326-334.
- [94] H. T. Clarke, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 4571-4587.
- [95] R. Torres Martin de Rosales, *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 5509-5513.
- [96] A. J. McShane, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25, 1694-1704.
- [97] M. Stadlmeier, *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57, 2958-2962.
- [98] N. A. Kulak, *et al.*, *Nat. Methods* **2014**, 11, 319.
- [99] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 1367.
- [100] J. Marcos, O. J. Pozo, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, 162, 41-56.
- [101] C. Seger, *Wien. Med. Wochenschr.* **2012**, 162, 499-504.
- [102] A. S. Dobs, *Steroids* **2008**, 73, 1305-1310.
- [103] S. ROBINSON, *et al.*, *BJOG* **1992**, 99, 232-238.
- [104] A. B. Araujo, *et al.*, *J. Clin. Endocr. Metab.* **2007**, 92, 4241-4247.
- [105] M. Sofikerim, *et al.*, *Urol. Int.* **2007**, 79, 13-18.
- [106] C. Wang, *et al.*, *Diabetes Care* **2011**, 34, 1669-1675.
- [107] H. A. Fink, *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, 91, 3908-3915.

- [108] N. Kojima, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13208-13209.
- [109] A. Mehta, *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5441-5444.
- [110] T. Higashi, *et al.*, *Biomed. Chromatogr.* **2008**, 22, 34-43.
- [111] K. D. W. Roth, *et al.*, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17, 255-274.